



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de medicina veterinária

ABORDAGEM PRÁTICA AOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITE EQUINA

ANA CATARINA VIEIRA GALHÓS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Maria Manuela C. Monteiro de Oliveira

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

ORIENTADOR

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

CO-ORIENTADOR

Doutor Mário Alexandre Gonçalves Quaresma

2018

Lisboa



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

ABORDAGEM PRÁTICA AOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE ENDOMETRITE EQUINA

ANA CATARINA VIEIRA GALHÓS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Graça Maria Leitão Ferreira Dias

Doutora Maria Manuela C. Monteiro de Oliveira

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

ORIENTADOR

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

CO-ORIENTADOR

Doutor Mário Alexandre Gonçalves *Quaresma*

2018

LISBOA

DECLARAÇÃO

Nome: _____

Endereço eletrónico: _____ Telefone: _____

Número do Bilhete de Identidade: _____

Título: Dissertação

Abordagem prática aos métodos de diagnóstico de endometrite equina

Orientador:

Dr. Miguel Louro Bliebernicht

Co-Orientador:

Doutor Mário *Alexandre Gonçalves* Quaresma

Ano de conclusão: 2018

Designação do Mestrado ou do ramo de conhecimento do Doutoramento:

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da ULisboa, _____ de _____ de 2017

Assinatura: _____

Difficult roads often leads to beautiful destinations

Agradecimentos

Um agradecimento a todos os que contribuíram, de diversas formas, para que este percurso fosse possível.

Um profundo agradecimento àqueles que me aturam diariamente, que se preocupam e que suportam o meu mau feitio e as minhas ausências constantes, que me apoiam e que me ajudam a ultrapassar os obstáculos. Um especial agradecimento também a todos os que me fizeram ser mais forte e que tiveram um papel na minha vida que me levou a aprender algo.

Um obrigado especial à minha mãe, o meu exemplo em tantas coisas, por todo o apoio e amor que demonstra e por ser a minha força. Ao meu pai, por ter sempre feito de mim mais forte e pelo orgulho que sei que tem. Aos meus avós, que se orgulham de mim.

Aos meus amigos, por serem os melhores, serem incondicionais e terem estado sempre presentes.

Ao Professor Doutor Mário Quaresma, pelo carinho, apoio e apreço não só nesta fase, mas ao longo de todo o percurso académico.

À Professora Doutora Graça Ferreira Dias pela ternura e ajuda incondicional.

À Doutora Isabel Oliveira da bioMérieux pelo patrocínio do meu estudo, simpatia e paciência.

Ao CIISA pelo apoio ao meu projeto.

À Doutora Carla Carneiro, pela disponibilidade, ensinamentos e enorme simpatia.

À Professora Doutora Manuela Oliveira pelo acompanhamento na parte da microbiologia.

Ao Doutor Telmo Nunes um grande agradecimento pela ajuda na parte estatística da tese.

Ao Dr. Miguel Louro Bliebernicht e à equipa da Embriovet, por me terem recebido no estágio curricular, pelo apoio ao projecto e por tudo o que me ensinaram.

À equipa da Equimuralha, à Dra Liliane Damásio e ao Dr Tomé Fino, por tudo o que me ensinaram, pelo apoio, pelo que me fizeram crescer e pelo carinho com que me receberam.

TÍTULO: Abordagem prática aos métodos de diagnóstico de endometrite em éguas

RESUMO

A endometrite é uma inflamação aguda ou crónica do endométrio com etiologia multifatorial, constituindo um dos principais desafios reprodutivos nos equinos, sendo a maior causa de infertilidade das éguas. É essencial o estudo da fisiopatologia e dos fatores que contribuem para o aparecimento da endometrite, pelo que é imperativo um correto diagnóstico etiológico e uma caracterização do grau de inflamação, de modo a ser estabelecido o tratamento adequado o mais precoce possível.

Um objetivo do presente trabalho foi utilizar um meio de cultura cromogéneo, normalmente utilizado para o diagnóstico de infeções urinárias em humanos, para a identificação de agentes etiológicos de endometrite equina. A vantagem deste meio é permitir um resultado presuntivo quanto ao agente da endometrite em 18/24h. Outro objetivo proposto neste estudo foi observar e descrever os achados citológicos e comparar a qualidade citológica com o método de recolha da amostra. Foram também descritos os agentes etiológicos isolados e a sua frequência. Este estudo teve lugar no centro de reprodução equina Embriovet, em Muge, durante a época de reprodução de 2018, com uma amostragem utilizada no estudo de 99 éguas.

Recorrendo à análise estatística, foi possível correlacionar algumas das variáveis estudadas, tendo sido utilizado o limiar de $P < 0,05$ para estabelecer as diferenças significativas. Verificou-se uma correlação positiva, estatisticamente significativa entre os resultados das galerias de identificação e os resultados presuntivos das placas cromogéneas. Não houve correlação estatisticamente significativa entre os achados citológicos e o agente isolado na cultura. Verificou-se que havia uma correlação estatisticamente significativa entre o resultado reprodutivo e o tratamento presuntivo direcionado para o agente identificado na cultura realizada na placa bipartida.

Este estudo poderia ser mais completo, e para isto, seria essencial proceder à identificação de todas as culturas através das galerias de identificação. Seria ainda imperativo utilizar os três métodos de recolha de amostra (zaragatoa, lavagem de alto volume e biópsia) em cada égua, permitindo assim proceder-se à análise citológica e microbiológica para cada método. No entanto os resultados foram promissores, tendo as culturas cromogéneas e as citologias revelado serem ambas importantes no diagnóstico e na implementação de um rápido e correto tratamento de endometrites em éguas. Verificou-se ainda que quando o tratamento foi direcionado para o agente identificado de forma presuntiva nas placas bipartidas, os resultados reprodutivos foram consideravelmente superiores.

Palavras-chave: *égua, endometrite, cultura microbiológica, citologia, diagnóstico*

TITLE: Approach to diagnosis methods of endometritis in mares

ABSTRACT

Endometritis is an acute or chronic inflammation of the endometrium with a multifactorial etiology and represents the main equine reproductive problem, being the major cause of infertility in the mare. Therefore, it is important to study the pathophysiology and the factors that contribute to the development of endometritis. A correct etiological diagnosis and the characterization of the degree of inflammation are both essential to establish the appropriate treatment as soon as possible.

The main objective of the present study was to test a chromogenic culture medium, usually used for the diagnosis of urinary infections in humans, for the identification of etiologic agents of equine endometritis. The advantage of this culture medium is to allow the presumptive diagnostic in 18/24 hours. Another objective proposed in this study was to describe the cytological findings and to compare the cytological quality with the sample collection method. Etiologic agents and their frequency has also been described. This study took place in Embriovet, a reproductive center located in Muge, during the 2018 breeding season, a sample of 99 mares in this study.

The statistical analysis allowed to correlate the variables studied, using the threshold of $p < 0.05$ to establish the significant differences. It was found a statistically significant correlation between the results of the identification galleries and the presumptive results of the chromogen plates. There was no statistically significant correlation between the cytological findings and the etiologic agent in the culture. It was found that there was a statistically significant correlation between the reproductive outcome and the presumptive treatment directed at the agent identified in the culture performed on the bipartite plate.

This work allowed us to conclude that it would be necessary to identify all the cultures through the identification galleries. It would also be essential to use the three methods of sample collection (swab, high volume lavage and biopsy) in each mare.

The results were promising, revealing that both chromogenic cultures and cytologies are important in the diagnosis and implementation of a rapid and correct treatment of endometrites in mares. It was also noted that when the treatment was directed to the agent presumptively identified on the bipartite plates, the reproductive outcomes were considerably higher.

.

Keywords: *mare; endometritis; microbiology culture, endometrial cytology, diagnosis.*

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	ii
Abstract.....	iv
Índice de figuras.....	ix
Índice de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xii
INTRODUÇÃO.....	1
PARTE I - relatório de estágio.....	3
PARTE II – Revisão bibliográfica.....	5
1. Endometrites.....	5
2. Fatores anatómicos que influenciam a suscetibilidade à endometrite.....	5
2.1. Vulva.....	6
2.2. Complexo vestibulo-vaginal.....	8
2.3. Cérvix.....	8
2.4. Útero.....	9
3. Remoção Física – <i>Clearance</i> uterina mucociliar.....	9
4. Mecanismos e mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.....	10
5. Tipos de afeções uterinas.....	13
5.1. Bacteriana.....	13
5.2. Fúngica	14
5.3. Pós-cobrição / Inseminação artificial.....	16
5.4. Endometriose.....	17
6. Diagnóstico de endometrite.....	18
6.1. Observação externa, palpação e ultrassonografia	19
6.2. Endoscopia do lúmen uterino.....	20
6.3. Biópsia.....	20
6.4. Citologia.....	23
6.4.1. Interpretação de citologias.....	25

6.4.1.1. Células epiteliais uterinas.....	25
6.4.1.2. Leucócitos.....	26
6.4.1.3. Eritrócitos.....	29
6.4.1.4. Bactérias.....	29
6.4.1.5. Fungos e leveduras.....	29
6.4.1.6. Detritos.....	30
6.4.1.7. Cristais de urina.....	31
6.4.1.8. Muco.....	31
6.4.2.Obtenção de amostras.....	32
6.4.2.1. Zaragatoa	32
6.4.2.2. Lavagem de baixo volume	33
7. Microbiologia.....	35
7.1. Meio CPSE.....	37
PARTE III - Estudo dos resultados de citologias de éguas suspeitas de endometrites	39
1. Objetivo.....	39
2. Material e métodos	39
2.1 Amostra.....	39
2.2 Recolha e processamento de amostras.....	40
2.2.1. Biopsia.....	40
2.2.2. Zaragatoa.....	41
2.2.3. Lavagem de alto volume.....	43
2.2.4. Citologia.....	44
2.2.4.1 Coloração Diff-Quik.....	44
2.3. Cultura no meio CPSE chromid elite.....	45
2.3.1 Coloração de gram.....	45
2.3.2. Teste da oxidase e catálase.....	46
2.3.3. Congelação de bactérias.....	48
2.4. Galerias de identificação.....	48
2.5. Análise estatística.....	49

3. Resultados.....	49
3.1. Caracterização dos parâmetros avaliados.....	50
3.2. Citologias.....	50
3.2.1. Método de recolha de amostra e resultados citológicos.....	53
3.3. Culturas microbiológicas.....	54
3.3.1. Resultados das cultura, citologia e métodos de recolha da amostra.....	54
3.3.2. Resultados da cultura e galerias de identificação.....	55
3.3.3. Características das colónias no meio cromogéneo	57
4.Resultados reprodutivos e resultados dos testes laboratoriais.....	60
5.Discusão.....	61
5.1Citologia.....	62
5.1.1. Método de recolha da amostra e resultados citológico.....	63
5.2. Cultura.....	63
5.2.1. Cultura, citologia e métodos de recolha da amostra.....	65
5.2.2. Resultados da cultura e das galerias de identificação.....	66
5.3. Resultado reprodutivo e dos testes laboratoriais.....	67
6. Conclusão.....	68
PARTE IV: Referências bibliográficas.....	70

Listas de figuras

Figura 1 – Conformação vulvar.....	7
Figura 2 – Proposta de modelo de defesa local uterina da égua.....	12
Figura 3 – Citologia demonstrando neutrófilos, um dos quais fagocitou <i>Candida Albicans</i>	15
Figura 4 – Citologia em que é possível ver <i>Candida albicans</i> em forma de leveduras e hifas.	16
Figura 5 – Endoscopia uterina.....	20
Figura 6 – Exemplos de zaragatoas e escovas citológicas.....	23
Figura 7 – Características citológicas do endométrio equino com as variações anuais do trato reprodutivo.....	26
Figura 8 – Preparação citológica recolhida por lavagem de baixo volume e concentrada por centrifugação, corada com Diff-Quik observada na objetiva 40x.....	27
Figura 9 - Hifa (identificado como <i>Aspergillus fumigatus</i>); 100x com óleo de imersão.	30
Figura 10 – Citologia com cristais de urina.....	31
Figura 11 – Citologia preparada a partir de uma amostra recolhida por zaragatoa. Corada com Diff-quick, observada na objetiva de 40x.....	32
Figura 12 – Ilustração da técnica de cultura por esgotamento em estria.....	36
Figura 13 – Esquema de inoculação com ansa de 10μ.....	37
Figura 14 – Enumeração semiquantitativa. Adaptado da bula das placas de gelose chromid CPS Elite.	38
Figura 15 – Imagem de ecografia uterina transrectal apresentando líquido intra-uterino.	40
Figura 16 – Imagem de biópsia depositada num lamina estéril para avaliação citológica.	41
Figura 17 – Exemplo de zaragatoa McCullough, zaragatoa acondicionada após a recolha e meio de transporte.....	42
Figura 18 – Ilustração do método utilizado para realizar as lâminas citológicas a partir de zaragatoa.	42
Figura 19 – Ilustração do método de sementeira com zaragatoa.	42
Figura 20 – Sonda de lavagem uterina criada na Embriovet.....	43
Figura 21 – Líquido recolhido de uma lavagem de alto volume, com turvação e cor amarelada. Imagem capturada com camara de 16mp.....	44
Figura 22 – Laminas dispostas sobre as placas, após fixação dos esfregaços para a coloração Gram.	46

Figura 23 – Teste de oxidase positivo.....	47
Figura 24 – Reação observada quando dispensado peróxido de hidrogénio numa cultura catalase positiva.	48
Figura 25 – Imagens de citologias coradas com Diff-Quik®.....	51
Figura 26 – Citologias uterinas coradas com Diff-Quik®.....	53
Figura 27 – Galerias de API®.....	56
Figura 28 – Esfregaço de uma colónia suspeita de ser <i>Staphylococcus spp</i> corado com coloração Gram (1000x).	58
Figura 29 – Fotografias de placas cromogéneas.	58

Lista de tabelas

Tabela 1 – Atividades e número de casos e frequência dos mesmos durante o estágio curricular.....	2
Tabela 2 – Classificação de biópsias quanto a alterações e taxa de parto esperada...	22
Tabela 3 – Classificação do grau de inflamação observado na citologia de amostras recolhidas por zaragatoa e biopsia.....	28
Tabela 4 – Classificação citológica quanto aos leucócitos em citologias recolhidas por lavagem de baixo ou alto volume.....	28
Tabela 5 – Classificação quanto aos detritos numa citologia.....	30
Tabela 6 – Identificação presuntiva do microrganismo em meio gelose ChromID CPSE elite.....	38
Tabela 7 – tabela utilizada para classificação de microrganismos quanto á oxidase e catálase.....	47
Tabela 8 – Frequência dos detritos encontrados.....	50
Tabela 9 – Frequência de cada bactéria nas culturas.....	54
Tabela 10 – Resultado das culturas, citologias e métodos de recolha da amostra.....	55
Tabela 11 – Resultado estatístico dos agentes identificados de forma presuntiva nas culturas e pelas galerias de identificação.....	55
Tabela 12 – Caraterísticas dos microrganismos identificados.....	57
Tabela 13 – Resultados das culturas e dos resultados reprodutivos.....	61

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

=	Igual
°C.	Graus Celsius
®	Marca registada
n	Números de casos
<	Menor
>	Maior
µl	Microlitro
%	Percentagem
IA	Inseminação artificial
β-GLU	β-glucuronidase
β-GAL	β-galactosidase
C3	Componente 3 do complemento
C5	Componente 5 do complemento
CPSE	
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELA	Elastase
hpf	High power field
Ig	Imunoglobulinas
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
KESC	
Lda	Limitada
LAV	Lavagem de alto volume
LBV	Lavagem de baixo volume
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
PMN	Polimorfonuclear neutrófilos
PG	Prostaglandina
PGE ₂	Prostaglandina E2
PG	Prostaglandina
ROS	Espécies reativas de oxigénio
TSA	Teste de sensibilidade a antibiótico

Introdução

A endometrite bacteriana é considerada a doença reprodutiva mais importante na égua e está associada a consideráveis perdas económicas (Troedsson, 1997). No entanto, nas endometrites não venéreas, os fatores de risco, como o compromisso dos mecanismos de defesa uterina ou uma pobre conformação perineal, são o principal desafio (Hurtgen, 2006; Leblanc & Causey, 2009). A inflamação uterina (endometrite) é a causa mais comum de mortalidade embrionária precoce (durante os primeiros 35 dias após concepção) em éguas ciclicamente normais (LeBlanc, 2003). Hurtgen (2006) considera que a inflamação e/ou infeção do útero pode ser classificada como aguda, crónica, ativa, subclínica, de pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, induzida pela cobrição ou persistente, entre outras.

Uma complexidade de fatores da égua e dos microrganismos contribuem para a patogenicidade da endometrite. Éguas velhas, defeitos na anatomia do trato genital, na drenagem linfática, na *clearance* mucociliar, na função cervical, diminuição das contrações do miométrio e a degeneração vascular, são fatores que mais contribuem para o aumento da suscetibilidade à endometrite (Troedsson, 1999). Éguas que apresentam uma boa *clearance* mucociliar são designadas como resistentes, pelo contrário, as que têm esta capacidade comprometida são denominadas éguas suscetíveis (Katila, 1996). Para além dos fatores intrínsecos ao animal, várias características microbianas têm sido relacionadas com a ocorrência de endometrites, como a capacidade de induzirem a inflamação, a aderência ao epitélio e a resistência à fagocitose. O diagnóstico de endometrite é feito através da deteção de fluido na imagem ecográfica, descargas vaginais, encurtamento do tempo entre ciclos éstricos e testes laboratoriais (citológicos e microbiológicos) positivos. Estes sinais nem sempre estão presentes nas endometrites subclínicas, estas são caracterizadas por outros sinais como a presença de edema excessivo após a inseminação e a presença à ecografia de uma linha branca (ecogénica) entre as pregas uterinas. Estes casos nem sempre são simples de diagnosticar por não apresentarem sintomatologia ou por serem infeções crónicas latentes (Leblanc & Causey, 2009).

Vários estudos vão no sentido de estabelecer uma correlação entre os achados citológicos e bacteriológicos. A avaliação bacteriológica, sem uma análise citológica complementar, pode conduzir a resultados falso-negativos ou falso-positivos. A obtenção de um resultado positivo por microbiologia nem sempre significa que existam bactérias no útero, uma vez que pode ter ocorrido contaminação cervical, vaginal ou durante o processamento da amostra (Nielsen et al., 2010). Consequentemente, recomenda-se cruzar os resultados microbiológicos com os dados da citologia de modo a evitar falsos-positivos. A análise citológica é bastante útil e alguns autores consideram que é mais sensível que o exame bacteriológico (Riddle, LeBlanc, & Stromberg, 2007). Existem diversos métodos de recolha de amostras uterinas como as zaragatoas uterinas sem proteção ou com proteção dupla, lavagem uterina de alto ou baixo

volume, escova citológica e biópsia (Riddle et al., 2007; Bohn, Ferris, & Mccue, 2014; Walter, Neuberg, Failing & Wehrend, 2012).

Os isolados de *Streptococcus* β -hemolítico, juntamente com os isolados de *Escherichia coli*, são os mais prevalentes em culturas uterinas de éguas (Albihn, Baverud, & Magnusson, 2003; Aguiar et al., 2005; Leblanc & Causey, 2009). A presença deste microrganismo no endométrio é normalmente acompanhada de resposta inflamatória. O compromisso dos mecanismos de defesa uterinos resulta em infeções persistentes por *Streptococcus* β -hemolítico e/ou *Escherichia coli*, provenientes da vagina (Klein, Ennen, Huchzermeyer, Weiss & Wehrend, 2009). O número de colónias encontrado nas culturas microbiológicas não se correlaciona positivamente com o número de neutrófilos na citologia (Walter, Neuberg, Failing, & Wehrend, 2012).

Os métodos de diagnóstico de endometrites são uma área em desenvolvimento. É imperativo identificar os agentes causadores de inflamação num menor espaço de tempo e com maior precisão, diminuindo, conseqüentemente, o impacto económico.

A importância que as endometrites assumem e o seu impacto na fertilidade está documentada, assim como a dificuldade em diagnosticar atempadamente a causa da inflamação. O objetivo deste trabalho foi utilizar um meio cromogénico, descrito para a utilização em culturas de urina humanas, para a identificação de agentes de endometrites em éguas. Este meio acrescenta valor ao diagnóstico da bactéria patogénica causadora da endometrite por permitir uma identificação, que, apesar de presuntiva, é obtido em 18 a 24h. Pretende-se ainda correlacionar os resultados das culturas no meio cromogénico com os resultados das galerias de identificação, assim como descrever os achados citológicos e os resultados da cultura microbiológica. Será ainda feita uma descrição limitada dos métodos de recolha de amostra e dos resultados das citologias e culturas.

Nesta dissertação é apresentada uma revisão bibliográfica relacionada com o tema, que compreende uma abordagem geral sobre as endometrites equinas, incluindo a etiologia e os fatores que predispõem ao seu aparecimento, bem como os mecanismos de defesa uterina e fisiopatologia da inflamação do útero e os métodos de diagnóstico. Relativamente ao trabalho experimental realizado, são descritos os materiais e métodos utilizados e, posteriormente, são apresentados os resultados e a sua discussão, seguindo-se as considerações finais sobre o tema.

CAPÍTULO I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O sexto ano do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi dividido em dois períodos de estágio. O primeiro, de âmbito extracurricular, foi realizado na Equimuralha, Lda., sob a orientação da Dra Liliane Damásio e do Dr. Tomé Fino, teve a duração de cerca de quatro meses, entre outubro e janeiro de 2018. O segundo estágio, curricular, foi realizado na Embriovet - prestação de serviços veterinários, Lda., sob a orientação do Dr. Miguel Louro Bliebernicht. Seguidamente vão ser apresentadas as atividades efetuadas no estágio curricular.

O estágio curricular que deu origem a esta dissertação foi realizado na Embriovet - prestação de serviços veterinários, Lda., sediada em Muge, concelho de Salvaterra de Magos. O referido estágio incluiu as atividades de clínica veterinária reprodutiva ambulatoria e de clínica diária no Centro de reprodução. Este estágio teve a duração de cinco meses, entre fevereiro e julho de 2018, completando um total de 1500 horas. Durante este período acompanhei o trabalho do Dr. Miguel Bliebernicht e da restante equipa.

O trabalho desenvolvido durante o período de estágio incidiu sobretudo na área da reprodução equina, tendo sido efetuado um controlo reprodutivo a 99 éguas. Este foi realizado principalmente no centro de reprodução e também nas explorações dos clientes, onde assisti e participei nas várias atividades desenvolvidas, nomeadamente:

- Participação nas atividades diárias do centro como o manejo, a distribuição de alimentação e a realização de camas.
- Acompanhamento reprodutivo diário e noturno das éguas para inseminação com sémen refrigerado e congelado, através do exame do trato reprodutivo por palpação e ecografia transretal. Foram observadas as características do útero, nomeadamente a presença de edema das pregas endometriais, edema esse classificado numa escala de 0 a IV e a presença de fluido intrauterino e suas características. Foi também monitorizada a evolução folicular, relativamente ao tamanho, forma, localização dos folículos, consistência folicular, ecogenicidade do folículo e dor à palpação, com o intuito de prever o momento de ovulação;
- Execução e participação em decisões terapêuticas como: manipulação hormonal (prostanglandina, ocitocina e progesterona), indução da ovulação (com triptorrelin ou deslorrelina) das éguas que apresentavam à ecografia um folículo com diâmetro maior ou igual a 35 mm de diâmetro e edema uterino grau III, estes parâmetros eram variáveis com o historial das éguas, experiência do médico veterinário e plano de tratamento de endometrite (administração de ocitocina, lavagem uterina e colocação de antibiótico intrauterino).
- Observação de recolhas de embrião (n=24) e inovulação na égua recetora.
- Observação e execução de zaragatoas uterinas, lavagem de baixo volume e biópsias.
- Processamento laboratorial de amostras para culturas de microbiologia e citologias.
- Recolha de sémen equino, com recurso a vagina artificial e através da utilização de um maneiquim fixo, de uma égua com peias na casa do cliente ou com o cavalo em estação;

- Processamento de sémen para refrigeração ou congelação, para utilização por parte da Embriovet e envio de doses para colegas médicos veterinários localizados em Portugal e no estrangeiro;

As atividades relacionadas com o controlo reprodutivo realizadas durante o período do estágio, que se encontram resumidas na tabela 1, incluíram ainda inseminação artificial (IA) com sémen refrigerado e congelado, diagnósticos de gestação por ecografia transretal aos 12 dias após IA, recolha de embriões para transferência (lavagem uterina no dia 8 após IA), inovulação nas éguas recetoras, cuidados neonatais e esmagamento de vesículas embrionárias.

Tabela 1 – Atividades e número de casos e frequência dos mesmos durante o estágio curricular

Atividade	Nº de casos (n)	FR (%)
Controlo reprodutivo	1950	68,8%
Inseminação artificial	193	7%
Recolha de sémen	31	1%
Lavagem para recolha de embriões	210	7%
Lavagem uterina	260	9%
Diagnóstico de gestação	187	7%
Cuidados neonatais	4	0,1%
Esmagamento de vesículas embrionárias	3	0,1%
Total:	2838	100%

Este estágio foi muito enriquecedor, tanto a nível profissional como pessoal. Sendo a casuística elevada, tive a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos teóricos e práticos na área da reprodução equina. Foi-me dada a oportunidade de participar em diversas tarefas, nomeadamente nas recolhas de sémen, palpação e ecografia transretal, tratamento e diagnóstico de endometrites, administração de fármacos, recolhas de sangue, cuidados neonatais e sincronização de recetoras. Foram 5 meses de aprendizagem constante num local com um ritmo intenso, em que pude experienciar um contacto mais próximo com o mundo profissional.

CAPÍTULO II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Endometrite

A endometrite é a maior causa de infertilidade em éguas e deriva da incapacidade uterina em remover bactérias, espermatozoides e exsudado inflamatório. Esta afeção tem uma prevalência de 25-60%, sendo frequentemente subdiagnosticada (Diel et al., 2016; LeBlanc et al., 2007). A endometrite origina falhas na concepção, perdas embrionárias, abortos durante o período de gestação, placentites, nascimento de poldros septicémicos, metrite e atrasos na concepção pós-parto (Leblanc & Causey, 2009).

A endometrite é uma inflamação aguda ou crónica do endométrio com etiologia multifatorial, podendo ter na sua origem um agente infeccioso (bacteriana, fúngica ou viral), uma resposta fisiológica como a que ocorre após a inseminação artificial (IA) ou cobrição e ainda ser resultante da aplicação de fluidos intrauterinos para lavagem ou recuperação embrionária (Palm et al., 2008). Huges and Loy demonstraram que após a inoculação de *streptococcus zooepidemicus* no útero de éguas jovens e éguas velhas, ocorreu uma reação inflamatória exuberante no útero das éguas jovens, enquanto que nas éguas velhas apenas se verificaram pequenas alterações. Passados alguns dias, as éguas jovens não apresentavam sinais de inflamação e infeção, enquanto as éguas velhas mantiveram uma infeção crónica com óbvia descarga vaginal. Assim, foi possível concluir que a endometrite tem duas fases, uma fase aguda e uma crónica. Éguas que são propensas a endometrite, normalmente por falha na limpeza uterina entre outras causas, são classificadas como suscetíveis. Por sua vez, éguas denominadas como resistentes, são competentes na limpeza rápida de produtos de inflamação e detritos (Huges and Loy, 1969). Quando a endometrite está associada à cobrição, trata-se de uma resposta fisiológica essencial para a remoção dos espermatozoides e eventuais contaminantes introduzidos no útero. Quando esta reação ocorre em éguas resistentes, a inflamação e a limpeza uterina terminam ao fim de 24/36h após IA, muito antes do oócito fertilizado entrar no útero (5.5 dias após a ovulação) (Troedsson, 2006). As éguas suscetíveis, não sendo competentes na *clearence* dos produtos inflamatórios, estes persistem para além das 48 horas após a inseminação ou cobrição (Troedsson, 2006). O útero é por norma bem protegido da contaminação externa por barreiras físicas constituídas pela vulva, complexo vestibulo-vaginal e cérvix. Qualquer comprometimento das barreiras físicas predispõe a égua a uma endometrite crónica (Klein, Ennen, Huchzermeyer, Weiss & Wehrend, 2009).

2. Fatores anatómicos que determinam a suscetibilidade à endometrite

A fisiologia natural da égua torna-a um animal apto a evitar e a combater os agentes nocivos para o útero. A sua anatomia é composta por estruturas que funcionam como barreiras à contaminação do útero e outras que funcionam como reservatório de bactérias, que impedem

a colonização por bactérias patogénicas e fungos (Klein, Ennen, Huchzermeyer, Weiss & Wehrend, 2009). A vulva, o complexo vestibulo-vaginal e o cérvix são barreiras mecânicas, ao passo que a fossa do clitóris e a vagina são considerados reservatórios de bactérias (Dascanio, 2011).

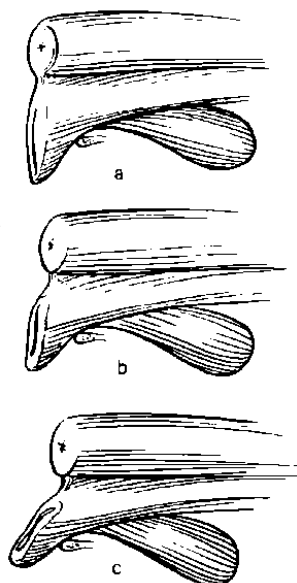
2.1. Vulva

A vulva é considerada a primeira barreira de proteção do útero contra infeções ascendentes (Papa et al., 2014). Os lábios vulvares normais são íntegros e firmes, reunindo-se uniformemente na linha média. A genitália externa deve ser avaliada na sua conformação e tônus muscular (McCue, 2008). Dascanio, 2011, refere que a vulva deverá ter uma posição vertical sem angulação relevante, referindo a utilização do índice de Caslick para a sua avaliação. A avaliação da angulação deverá ser sempre feita quando o relaxamento muscular atinge o seu máximo, ou seja, durante o estro. O índice de Caslick avalia a necessidade de uma égua efetuar uma vulvoplastia, multiplicando a angulação vulvar pelo comprimento da vulva que está acima da base da pélvis. Esta classificação é feita em 3 grupos: “Tipo I” - com pontuação inferior a 100 unidades considerada normal, sem necessidade de intervenção -; “Tipo II” – com pontuação compreendida entre 100 e 150 unidades, sendo o grupo intermédio que poderá ou não necessitar de intervenção -; e “Tipo III” – com pontuação acima de 150 unidades, sendo o grupo mais aconselhado a efetuar uma vulvoplastia. Caslick, em 1937 descreveu um procedimento que consiste em unir o terço superior da vulva, ainda hoje bastante utilizado. Este procedimento reduz ou elimina a aspiração de ar, a contaminação fecal e de outros agentes de endometrite, diminuindo a quantidade de culturas positivas. Outras técnicas como a de episioplastia e a transecção do corpo perineal foram posteriormente implementadas (Trotter, G. W., 1988).

Sabe-se que à medida que a vulva ganha inclinação, como ocorre nos casos de recessão do ânus ou mau tônus muscular, aumenta o risco de contaminação fecal. A vulva deve ter uma posição o mais vertical possível, permitindo que as fezes passem pela vulva sem contaminação. À medida que a vulva toma uma posição mais horizontal, a coaptação fica comprometida e facilita a acumulação de fezes. A má coaptação vulvar tem como resultado aspiração de ar (pneumovagina) e, quando existem fezes acumuladas na zona da vulva, estas são também aspiradas para a vagina, ocorrendo assim contaminação fecal (Papa et al., 2014). O traumatismo da vulva e a diminuição do tônus muscular podem conduzir a um comprometimento da coaptação vulvar, como consequência da falha na coaptação há um aumento da predisposição a pneumovagina (Figura 1) (McCue, 2008). A progesterona tem também um papel relevante na angulação vulvar, uma vez que, quando sob o efeito desta hormona a vulva tem um tônus superior ao que apresenta quando sob o efeito de estrogénios, por esta razão certas éguas só apresentam pneumovagina durante o estro. A entrada de ar acontece quando os lábios vulvares estão parcialmente abertos, sendo o resultado de uma

incompetência vestibular (Trotter & McKinnon, 1988). A detecção de pneumovagina em éguas com uma conformação razoável pode ser feita através da observação de pequenas bolhas de ar com coloração fecal no muco vestibular, da presença de muco vaginal em redor do cérvix ou quando, através da palpação transretal, é possível sentir uma “vagina balão” (Thornbury, 1975). Uma vaginite inicial, resultante de uma má coaptação vulvar, conduz a uma cervicite e por fim a endometrite, o que vai resultar em subfertilidade (Pycock, 2009). Defeitos na conformação vulvar podem ser congénitos, o que é muito raro, ou adquiridos, como nos casos de relaxamento vulvar consequente a repetidos partos, lesões provocadas por partos distócicos, consequentes da cobertura natural, por reprodução assistida ou por uma condição corporal deficiente como é no caso de éguas velhas e de éguas em competição (Noakes 2001; Pycock, 2009). Ao ser avaliada a conformação vulvar de éguas, verificou-se que as taxas de gestação mais altas foram observadas em éguas com conformação vulvar normal, comparando com éguas que apresentavam má conformação (Hemberg, Lundeheim, & Einarsson, 2005; Christoffersen et al., 2015). Os mesmos autores também relataram que éguas com má conformação vulvar, que não são submetidas a vulvoplastia, têm maior tendência a desenvolverem endometrites bacterianas após a monta natural ou IA. Hemberg, Lundeheim, e Einarsson (2005) observaram, através da análise citológica, que éguas com comprometimento vulvar estão predispostas a inflamação endometrial.

Figura 1 – Conformação vulvar. Adaptado de Trotter & McKinnon, 1988.



Legenda: a) Conformação normal, os lábios vulvares estão verticalmente ao arco isquiático. B) Os lábios vulvares apresentam falhas na coaptação quanto mais dorsal é o posicionamento dos lábios em relação ao arco isquiático. C) Em éguas velhas ou com deficiente condição corporal os lábios vulvares assumem uma posição horizontal com o afundamento do ânus. As coaptações vulvares e vestibulares estão comprometidas.

2.2. Complexo vestibulo-vaginal

O complexo vestibulo-vaginal funciona como segunda barreira protetora do trato reprodutivo contra as contaminações externas. Este complexo está localizado dorso-cranialmente à abertura do orifício uretral (Easley, 1988). A ligação vestibulo-vaginal deverá ser o mais perpendicular possível porque, quanto mais horizontal for esta ligação, mais provável é a entrada de contaminantes e a ocorrência de pneumovagina. Uma das formas de avaliar o declive desta ligação é através da separação dos lábios da vulva. Quando é visualizada a vagina significa que a ligação é bastante horizontal. Caso não seja facilmente observada a vagina, significa que a ligação ainda está dentro do que podemos considerar ideal (Dascanio 2011). Durante o estro, este complexo vestibulo-vaginal é o único fator isolante do útero, já que tanto a vulva como o cérvix se encontram com a musculatura relaxada devido ao efeito dos estrogénios (Noakes 2001). Para além da pneumovagina, há uma outra alteração denominada urovagina que ocorre por defeito na conformação pélvica ou perda de tónus muscular. Esta alteração permite que a urina passe através do cérvix durante o estro, dando origem à inflamação do cérvix e útero (Easley, 1988). É uma condição que ocorre frequentemente em éguas velhas (Troedsson et al. 1995) e está associada à diminuição do sucesso reprodutivo devido a alteração do pH do trato reprodutivo e da viabilidade do sémen. A irritação endometrial constante pode conduzir a uma luteólise prematura e consequente perda embrionária, quando esta condição persiste, leva a fibrose periglandular (Easley, 1988).

2.3. Cérvix

Tal como a vulva, também o cérvix tem a sua forma e tonicidade influenciada pelas hormonas ováricas. Durante o estro, onde existe uma dominância de estrogénios, a musculatura cervical encontra-se relaxada, no diestro esta encontra-se contraída devido à dominância da progesterona (Mina, Davies Morel & Newcombe, 2008). O cérvix pode ser avaliado por palpação direta, onde é possível avaliar o tónus, obstruções, aderências e outras anormalidades (McCue, 2008). As alterações de tonicidade e abertura cervical irão influenciar a suscetibilidade à endometrite. Éguas velhas ou atletas têm dificuldade em relaxar o cérvix durante o estro, levando à retenção de sémen, bactérias e produtos inflamatórios dentro do útero (McCue, 2008; Brinsko et al. 2011). Frequentemente, éguas com carreira desportiva apresentam disfunção do cérvix e uma reduzida contratilidade do miométrio, o que consequentemente, conduz à acumulação de líquido no lúmen uterino (Pycock, 2006). Podem ocorrer lacerações no cérvix durante o parto que levam a uma redução da fertilidade (McCue, 2008). A inserção do embrião no útero de éguas recetoras provoca uma resposta inflamatória, que normalmente se mantém subclínica. Esta inflamação estimula a libertação de prostaglandina, conduzindo a luteólise precoce, que indiretamente conduz à morte ou expulsão do embrião antes do reconhecimento materno (Koblischke, Kindahl, Budik, Aurich,

& Palm, 2008). O prognóstico de fertilidade em éguas com lacerações do cérvix ou outras condições que possam ser reparadas cirurgicamente é favorável (McCue, 2008).

2.4 Útero

O epitélio do endométrio possui células ciliares e secretoras de muco, que formam uma camada mucopolissacarídea (Causey, 2008). A presença destas células indica a existência de um mecanismo mucociliar para eliminação de produtos indesejados no útero. A camada mucopolissacarídea tem ainda como funções a proteção, hidratação e lubrificação do endométrio, dificultando a adesão de bactérias aos recetores celulares (Maischberger et al. 2008). Éguas velhas com vários partos, apresentam muitas vezes úteros pendulares, inclinados ventralmente em relação à base da pélvis, esta condição leva a um atraso na limpeza da contaminação uterina face a úteros com inclinação normal (LeBlanc, Johnson, Calderwood Mays, & Valderrama, 1995).

3. Clearance uterina física e mucociliar

A remoção física de detritos é uma etapa essencial para a limpeza de bactérias e produtos inflamatórios, contribuindo para que uma endometrite não se torne persistente (Troedsson, 1999). Para que ocorra uma remoção física eficaz, é fundamental a atividade mucociliar das células endometriais e a contração uterina, sendo a remoção final efetuada pela drenagem através do cérvix (Troedsson, 1999). A combinação entre as contrações uterinas e a propulsão do muco pelas células ciliadas impede que as bactérias adiram ao endométrio (Leblanc & Causey, 2009). Assim, qualquer alteração nestas funções terá uma repercussão negativa na eficácia da limpeza uterina. Éguas com úteros considerados normais expõem com sucesso o líquido intrauterino em 48 horas após a inoculação de bactérias, enquanto éguas com redução da contratilidade uterina acumulam líquido no lúmen uterino (Nikolakopoulos & Watson, 1999). Foi comprovado que éguas com suscetibilidade a desenvolver endometrites persistentes têm um comprometimento da contratilidade do miométrio em resposta a uma inflamação aguda, resultando em acumulação de fluido e produtos inflamatórios no lúmen uterino (Troedsson, 1999). Partos múltiplos e repetidas cobrições/IA levam a defeitos anatómicos como: conformação perineal deficiente, incompetência do esfíncter vagino-vestibular, relaxamento vaginal, cérvix incompetente e útero pendular; ou a alterações degenerativas como: anormalias no miométrio, fibrose periglandular, degeneração vascular, linfagiectasia, cicatrizes e atrofia das pregas endometriais e lesão do aparelho mucociliar (Knudsen, 1964; Leblanc & Causey, 2009). Evans et al., 1986, comprovaram que microsferas radioativas eram eliminadas com maior eficácia por úteros de éguas jovens que nunca pariram, do que por éguas velhas com historial de partos múltiplos. Enquanto as éguas resistentes limpam as microsferas em 24 horas, as éguas suscetíveis mantêm as microsferas até 96 horas após a inoculação (Troedsson & Liu, 1991). Utilizando eletromiografia para registar a atividade do

miométrio, foi observado que, em éguas suscetíveis, a atividade estava reduzida em resposta à inflamação (Troedsson et al. 1993).

A influência das contrações foi comprovada através da administração de fármacos uterotônicos em éguas com atraso na limpeza, sendo que esta administração resultou num tempo de limpeza normal. Por outro lado, em éguas com tempo de limpeza normal, quando lhes foi administrado um inibidor da prostaglandina, tornaram-se éguas suscetíveis com atraso na limpeza uterina (LeBlanc, 1994; Cardario, Thatcher, & Lemblanc, 1995). Foi então comprovada a importância das prostaglandinas na atividade miometrial, uma vez que a sua libertação terá como consequência o aumento da contractilidade do miométrio (Troedsson et al. 1993). Outro estudo demonstrou que a administração de clenbuterol e consequente inibição da atividade miometrial convertia éguas resistentes, em éguas suscetíveis (Nikolakopoulos & Watson, 1999). São então conhecidos alguns fatores que podem estar na origem da alteração nas contrações miometriais, como a diminuição da frequência, intensidade e duração da contractilidade do miométrio, alterações vasculares do endométrio, alteração da posição do útero, alteração da produção de muco e/ou respostas hormonais alteradas (Troedsson, 1999). LeBlanc et al. em 1994 descreveram que em éguas normais, com detritos no lúmen uterino após o encerramento do cérvix, os resíduos remanescentes são eliminados pela drenagem linfática. Em 1995, LeBlanc et al. compararam a eficiência e a taxa de drenagem linfática em éguas suscetíveis e resistentes. Concluíram então, que as éguas suscetíveis tinham uma diminuição da drenagem linfática, ao contrário das éguas resistentes. Este fenómeno foi associado à presença de falhas linfáticas diagnosticadas através de biópsias uterinas. Ferreira et al., 2015, ao avaliarem a *clearance* uterina em éguas após IA, observaram um aumento pronunciado e transitório da perfusão vascular uterina, durante as duas horas que se seguiram à IA.

Com base nos estudos realizados até à data, é possível inferir que as causas de falhas na *clearance* uterina podem advir de uma deficiente conformação perineal, cérvix fibrosado, fraca contração uterina, idade, multiparidade, má drenagem linfática e comprometimento vascular. Éguas velhas com vários partos, apresentam um útero mais flácido e relaxado, consequentemente têm uma maior acumulação de fluido no lúmen uterino e limpeza deficiente do mesmo (Nikolakopoulos & Watson, 1999).

4. Mecanismos e mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios

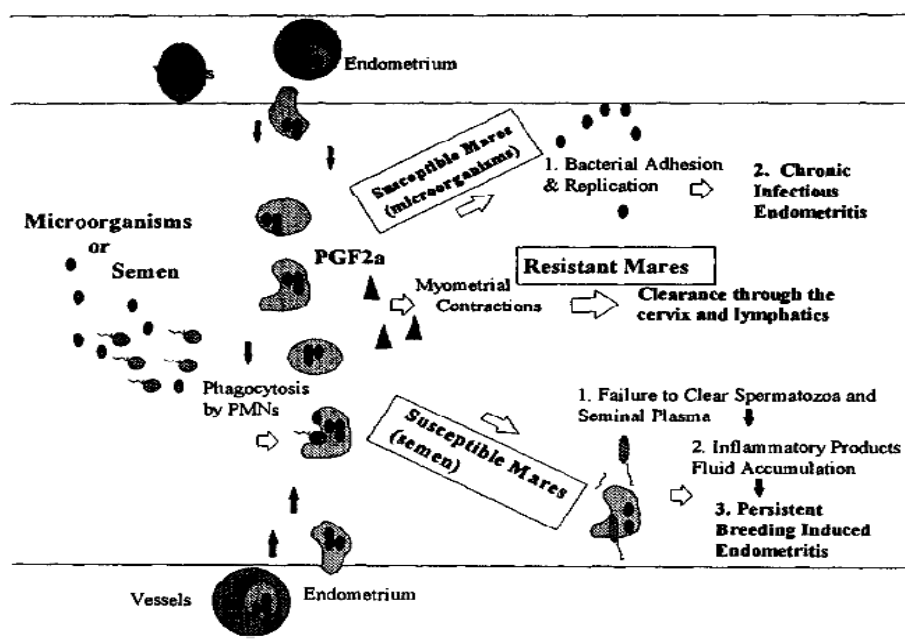
Troedsson, Loset, Alghamdi, Dahms e Crabo, 2001, constataram que a sobrevivência de um embrião é incompatível com a presença de bactérias e produtos inflamatórios, sendo crucial que a competência da égua na remoção destes produtos. A infeção e/ou inflamação do útero podem ser causadas por diversos agentes, nomeadamente detritos, bactérias, sémen, fungos ou vírus. São complexos os mecanismos de defesa contra as agressões uterinas, desde o

sistema imunitário humoral a substâncias bactericidas e ainda fatores mecânicos. A defesa uterina inicia-se com a destruição local dos agentes por neutrófilos, seguindo-se a eliminação e a neutralização por anticorpos uterinos e terminando com a remoção física dos produtos resultantes, através da drenagem pelo cérvix e pela via linfática (Troedsson, 1999).

Os polimorfonuclears neutrófilos (PMNs) são a primeira linha de defesa do sistema imunitário inato contra microrganismos invasores (Brinkmann, 2011). Os PMNs chegam ao lúmen uterino, logo após o estímulo inflamatório, cerca de 30 minutos após a entrada do agente (Doty et al., 2011, Katila 1996). Após a detecção da presença de agentes patogénicos nos tecidos, os mastócitos e os macrófagos residentes nos tecidos libertam quimiocinas tais como a interleucina-8, IFN- γ e C5, que atraem os PMNs (Brinkmann, 2011). O complemento medeia uma série de reações biológicas contra o agente exógeno, tais como um aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia, opsonização antes da fagocitose, ativação das lípases da membrana e lise de organismos alvo (Watson, Stokes & Bourne., 1987; Troedsson et al., 1993). A ativação do complemento resulta na clivagem dos fatores C5a e C3b. A secreção uterina é rica em complemento, sendo provável que a interação entre os espermatozoides e a secreção uterina resulte em quimiotaxia mediada por C5a e na migração de neutrófilos para o lúmen uterino. Após a diapedese dos neutrófilos para a parede dos vasos do endotélio, estes migram até ao local onde se encontram as quimiocinas, ou seja, o local da infeção. Os agentes fagocitados pelos PMNs são destruídos por péptidos como catelicidinas e defensinas. São também eliminados por proteases (elastase neutrofílica, catépsina β e proteinase 3) e por espécies reativas de oxigénio (ROS) (Brinkmann, 2011). Os neutrófilos têm ainda a capacidade de eliminar o agente patogénico através da libertação de ácido desoxirribonucleico (DNA), em resposta ao estímulo infeccioso, formando redes extracelulares de neutrófilos (NET) (Rebordão et al., 2014). Esta estrutura é eficaz contra bactérias Gram-positivas e negativas, mas também contra fungos e parasitas (Brinkmann, 2011). Rebordão et al. (2014) comprovaram que os PMNs equinos presentes no útero, quando estimulados pela presença de uma endometrite por *Streptococcus equi subespécie zooepidemicus* ou *Escherichia coli*, têm uma capacidade notável de produzir NETs. Embora os PMNs tenham a capacidade de formar NETs localmente quando na presença de microrganismos, algumas bactérias desenvolveram mecanismos de degradação das NETs (Berends et al., 2010). Os componentes dos NETs (histonas, elastase, catépsina G, mieloperoxidase), além de eliminarem os microrganismos (Brinkmann, 2011), contribuem para a fibrose endometrial na égua (Rebordão et al., 2018). A concentração de PMNs vai crescendo rapidamente até atingir um pico às 12 horas após o estímulo inicial e decresce a partir do pico até às 24 horas (Katila 1996). A concentração máxima de neutrófilos não difere entre éguas suscetíveis e éguas resistentes, mas o tempo em que esta concentração se mantém elevada difere, sendo que nas éguas suscetíveis os neutrófilos permanecem elevados por um período mais longo.

Geralmente em éguas resistentes, a concentração começa a diminuir gradualmente e às 48 horas pós-estímulo é próxima de zero (Figura 2) (Katila 1996).

Figura 2 – Proposta de modelo de defesa local uterina da égua. Adaptado de Troedsson, 1999.



As imunoglobulinas (Igs) são também parte do sistema imunológico que inicia e amplifica a resposta inflamatória. A sua produção é maioritariamente local, já que a difusão passiva de Igs no útero é mínima, sendo as IgG e IgA produzidas localmente (Troedsson, 1999). A concentração de Igs não varia com as alterações do ciclo uterino, nem a sua concentração é relevante para determinar se uma resposta é eficaz ou não (Troedsson 1999, Katila 1996). É possível concluir que a eficácia da defesa uterina não depende apenas da resposta humoral. Contudo, a defesa uterina mediada por anticorpos é importante para que a resposta imunitária seja eficaz em éguas suscetíveis, uma vez que as concentrações de Igs na secreção uterina são semelhantes ou até elevadas, quando comparadas com éguas resistentes. Estes achados sugerem que a fisiopatologia da suscetibilidade à endometrite tem origem noutros fatores (Troedsson, 1999).

Kotilainen, Huhtinen, e Katila (1994) e Troedsson et al. (1995) constataram que uma inoculação asséptica de espermatozoides desencadeava uma resposta inflamatória semelhante à provocada após uma inoculação de agentes bacterianos. A conclusão de diversos estudos in vitro foi que os espermatozoides ativam o complemento. Uma vez no lúmen uterino, os PMNs fagocitam bactérias e espermatozoides, sendo uma parte importante na eliminação de agentes no trato reprodutivo. Não é claro como os espermatozoides são opsonizados e se a fagocitose de espermatozoides equinos é um processo seletivo ou não

seletivo (Troedsson et al., 2001). Quando ocorre uma falha na limpeza natural fisiológica dos agentes causadores da inflamação, provavelmente, resultará num ambiente intrauterino favorável ao crescimento bacteriano ou fúngico, sendo no entanto desfavorável à sobrevivência do embrião (Troedsson et al., 2001). A eficiência da fagocitose pelos neutrófilos é dependente da presença de opsoninas no local da infecção. As IgG e o sistema do complemento são as principais opsoninas que interagem com os agentes exógenos, de forma a torná-los mais suscetíveis à ação dos neutrófilos (Varner & Blanchard, 1990).

5. Tipos de endometrites uterinas

5.1. Bacteriana

As diferentes bactérias, expressam diferentes fatores de virulência e diferentes formas de invadir o sistema imunitário, o que pode resultar numa vasta diversidade de sinais clínicos, ultrassonográficos e achados laboratoriais (Leblanc, 2010). As éguas que apresentam menor capacidade de resposta à infecção, podem apresentar sinais clínicos de endometrite como descarga vaginal, 2 a 10 dias pós-cobrição, e uma elevada redução de fertilidade (Brinsko et al. 2011, Troedsson 2011). Durante a fase aguda, há maior produção de muco pelas células epiteliais criando uma camada que protege o endométrio, por sua vez, nas inflamações crônicas há perda epitélia e da camada de muco protetora, dando oportunidade às bactérias de aderirem à mucosa (Causey et al., 2008)

Os agentes etiológicos isolados de amostras uterinas são *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp. e *Klebsiella pneumoniae* (Tibary et al. 2007; Nielsen et al., 2010; Troedsson 2011). Outros organismos que poderão ser identificados, e que são consideradas bactérias comensais, são o *Actinomyces pyogenes*, *Proteus* spp. e *Staphylococcus* spp. Estas bactérias só são consideradas patológicas no caso de existirem evidências clínicas, citológicas e histopatológicas que as apontem como a causa primária de endometrite (Tibary et al. 2007; Brinsko et al. 2011).

Existe ainda uma bactéria transmitida venereamente, que é responsável pela metrite contagiosa equina, doença de declaração obrigatória à OIE (OIE 2012), é altamente contagiosa e patogénica, denominada *Taylorella equigenitalis*.

Os sinais clínicos de endometrite bacteriana podem variar consoante a cronicidade e o tipo de bactéria, por exemplo, a *Escherichia coli* (*E.coli*) e alguns fungos aderem ao epitélio endometrial, formando placas focais que tornam difícil a remoção física durante a recolha da amostra (Leblanc, 2010; Rasmussen et al., 2015). Quando se está na presença de uma infecção por *E.coli*, existe menor probabilidade de se ter uma citologia positiva, do que no caso de infeções por *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp. ou leveduras. A

E.coli está normalmente associada a repetidas inseminações, sem apresentar no entanto sinais clínicos (Riddle, Leblanc & Stromberg, 2007).

Isolados pertencentes à espécie de *Streptococcus* β -hemolítico são um dos agentes mais frequentemente associado à endometrite clínica. Este apresenta uma capacidade de manter uma infeção latente crónica ao instalar-se em zonas profundas do endométrio, e quando a infeção está numa fase ativa, estimula a produção de um exsudado inflamatório, que interfere com a fagocitose dos neutrófilos (Albihn, Baverud, & Magnusson, 2003; LeBlanc et al., 2007; Leblanc, 2010; Christoffersen et al., 2015). Christoffersen et al. 2015, na sua publicação, faz em referência a um estudo recente de Mitchell AMC e Bojesen AM, não publicado, em que comprovaram que 90% dos abortos e placentites no Kentucky são causados por *Streptococcus zooepidemicus*. Christoffersen et al. 2015 encontraram uma prevalência de *Streptococcus* (86%) mais elevada do que está descrito em estudos anteriores, o que pode ser justificado pelo facto de neste estudo as amostras terem sido recolhidas após a inseminação, que é um conhecido fator de ativação de infeções crónicas latentes (Rasmussen et al., 2015). Outros fatores de ativação de infeções latentes por *Streptococcus zooepidemicus* são a presença de *E.coli* e infusões com sal de fosfato tamponado (PBS), (Christoffersen et al., 2012). Albihn et al. em 2003, estudaram os agentes etiológicos uterinos e a suscetibilidade dos mesmos em 239 éguas, a bactéria com maior prevalência foram isolados de *E.coli*, seguida de *Streptococcus* β -hemolítico e por último, fungos. Algumas bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e alguns fungos e leveduras são conhecidos por formarem biofilmes, garantindo assim, a sobrevivência de microcolónias, resultando em infeções crónicas e persistentes, resistentes aos antibióticos (Donlan & Costerton, 2002; Beehan et al., 2015).

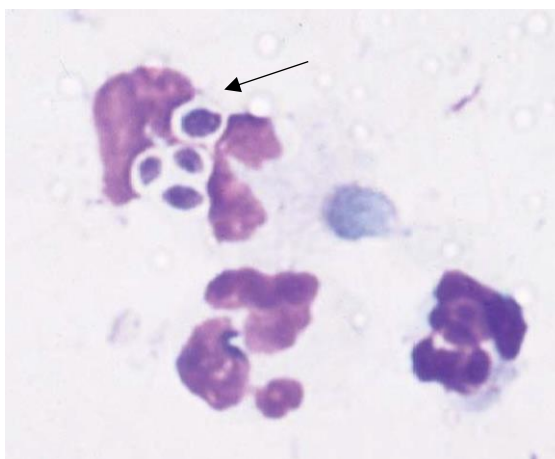
Pouco se conhece da flora vaginal das éguas, em 2008, Fraga, Perelmuter, Delucchi, Cidade e Zunino, isolaram *Lactobacillus* em setenta por cento de éguas normais, não tendo sido ainda estudada a relevância da presença desta bactérias em éguas

5.2. Fúngicas

O termo fungo refere-se tanto a leveduras como a fungos filamentosos. Alguns fungos são dimórficos e existem em ambos os estados sob certas condições de crescimento (Tortora, Funke & Case, 1998). Fungos foram relatados em ambas as formas no trato reprodutivo equino (Pugh et al. 1986).

Uma endometrite fúngica é uma situação relativamente rara, ocorrendo em menos de 5% das endometrites diagnosticadas (Figura 3).

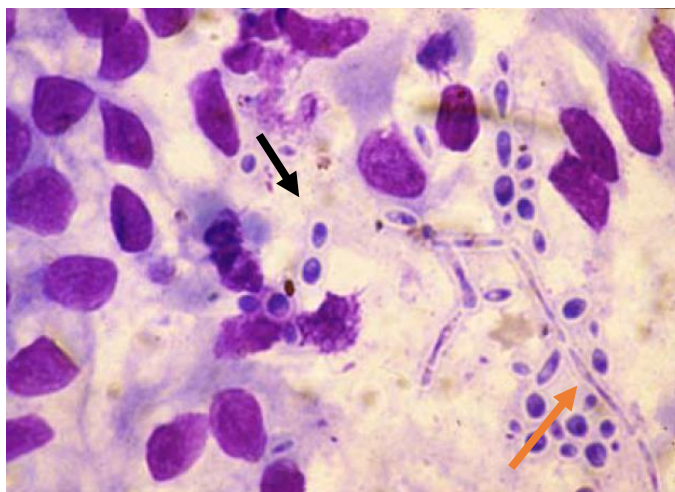
Figura 3 – Citologia demonstrando neutrófilos, um dos quais fagocitou *Candida Albicans* (seta preta). Adaptado de Dascanio, Ley, & Schweizer, 2000.



Nas últimas décadas houve um aumento no número de casos de endometrite fúngica (Liu & Troedsson, 2008). Este facto pode dever-se à maior exposição das éguas a fatores facilitadores e predisponentes para a colonização fúngica, pois os elementos fúngicos que causam doenças reprodutivas, são geralmente oportunistas, requerendo condições propícias para estabelecer infecção. Os fungos afetam apenas éguas com alterações uterinas, como por exemplo em casos de pneumovagina, alteração do ambiente uterino ou vaginal, endometrite crónica e utilização repetida de antibiótico (Dascanio et al., 2000; Stout, 2008). Éguas às quais é administrada progesterona, têm também maior predisposição para endometrite fúngica derivado à diminuição da capacidade de fagocitose dos neutrófilos, à alteração da atividade muscular uterina e ao aumento do tônus do cérvix. Outros fatores que contribuem para a presença de infecções fúngicas são um ambiente húmido, exposição a uma grande quantidade de fungos e a presença de um foco necrótico, como ocorre em casos de traumatismo, infecção e isquemia (Carter & Chengappa, 1995). Geralmente as fontes mais comuns de fungos causadores de doença reprodutiva em éguas, são fecais e com origem na superfície da pele, sendo o trato reprodutivo caudal o reservatório primário de agentes que colonizam o útero, incluindo a vagina e a genitália externa. Também é de considerar a contaminação por matéria fecal e a iatrogénica (Dascanio et al., 2000; Dascanio, Schweizer & Leyt, 2001). Existem vários fungos que podem ser isolados do trato reprodutivo equino, sendo os mais comuns *Candida albicans* e *Aspergillus spp.* Nos casos de infecções por *Candida albicans*, foi reportada uma diminuição da imunidade celular, que pode ser explicado pelo aumento de prostaglandina E₂ produzida pelos macrófagos em resposta aos antígenos do fungo (Dascanio et al., 2000). Alguns fungos têm a capacidade de invadir os tecidos, como a *Candida albicans*, que cresce intracelularmente (Dascanio et al., 2000) e tem a capacidade de produzir um biofilme, que é eficaz na defesa contra os antifúngicos, defesas imunológicas uterinas e esterilização de materiais e proporcionando uma grande capacidade de aderência ao epitélio e impermeabilização (Alvarenga, 2008). A *Candida albicans* pode aparecer nas citologias na

forma de levedura, pseudo-hifa e hifa (figura 4), (Alvarenga, 2008). O *Aspergillus spp.* aparentemente é capaz de causar maior lesão no endométrio por produzir e libertar enzimas, como a elastase, e por ser um fungo filamentososo, tem melhor habilidade para penetrar os tecidos, provocando, consequentemente, uma infecção mais profunda (Alvarenga, 2008)..

Figura 4 – Citologia em que é possível ver *Candida albicans* em forma de leveduras (seta preta) e hifas (seta laranja). Adaptado de Alvarenga, n.d.



O diagnóstico deve incluir a história pregressa da égua e considerar os fatores predisponentes, como o uso repetido de antibióticos e inúmeros procedimentos terapêuticos e de diagnóstico intrauterinos. No exame físico pode ser observada uma descarga vulvar cinzenta. O prognóstico de éguas infetadas por fungos é reservado (Roszel & Freeman, 1988). A biópsia uterina é importante para se conhecer o grau de fibrose uterina e assim o prognóstico reprodutivo da égua (Dascanio et al., 2000). Um dos fatores essenciais para o sucesso no tratamento de infecções fúngicas é iniciar o tratamento numa fase inicial, onde os microrganismos ainda estão suscetíveis e nas camadas mais superficiais (LeBlanc & McKinnon 2011; Brinsko & Sertich, 2014).

5.3. Pós-cobrição / Inseminação artificial

A reação inflamatória transitória em resposta à presença de sémen no útero é uma reação fisiológica normal, sendo essencial para a sobrevivência e desenvolvimento normal do embrião (Katila, 1996; Troedsson, 2006). Esta reação serve para remover o excesso de espermatozoides, plasma seminal e contaminantes do útero antes de o embrião chegar ao útero por volta do dia 5,5 pós ovulação (Leblanc & Causey, 2009). Uma falha dos mecanismos de defesa uterinos na eliminação dos antígenos e produtos inflamatórios leva a uma endometrite persistente (Troedsson, 2006). Vários autores estudaram a reação inflamatória após a introdução de sémen e bactérias no lúmen uterino. Verificaram que passados 30 minutos, há presença de prostaglandina (PGE_2), leucotrieno B4 e outros ácidos araquidônicos no exsudado uterino, acompanhados de neutrófilos. Os metabolitos dos ácidos araquidônicos

conduzem a um aumento da permeabilidade vascular e ao influxo de proteínas séricas e neutrófilos no lúmen uterino, com o pico do número de neutrófilos entre as 4-8 horas depois da inoculação (Katila, 1996; Troedsson, 2006). Uma segunda vaga de neutrófilos ocorre perto das 12 horas. A maioria do fluído intrauterino é eliminado pelas contrações uterinas entre as 6-12 horas (Troedsson, 1997). A resposta à inseminação com 600 milhões de espermatozoides concentrados, tem um pico entre as 4 e 24 horas, mas os espermatozoides, bactérias e neutrófilos são removidos quase na sua totalidade, após 48h da IA em éguas férteis (Katila, 1995). Sinnemaa e a sua equipa, em 2005 provaram que a concentração e o volume de sémen utilizado na inseminação, não influenciam a contratilidade, nem a reação inflamatória uterina. O plasma seminal tem um papel importante na limpeza uterina, contribuindo para o transporte e para a sobrevivência dos espermatozoides viáveis e eliminação dos não viáveis. O plasma seminal atua suprimindo as ligações dos neutrófilos com os espermatozoides viáveis, mas não com os não viáveis e bactérias (Troedsson, 2006). O plasma seminal tem assim a capacidade de modelar a resposta inflamatória. As éguas suscetíveis acumulam líquido e mantêm o edema durante 3-5 dias após a inseminação (Causey, 2006). Tem sido verificada uma reação inflamatória prolongada induzida pela inseminação com sémen congelado. Foi sugerido que este aumento na duração da reação após a inseminação com sémen congelado, pode dever-se à remoção do plasma seminal durante o seu processamento, não sendo no entanto claro se este processo é suficiente para suprimir o efeito modulatório na inflamação induzida pela inseminação (Troedsson et al., 2001). A proteção seletiva dos espermatozoides contra a ligação e fagocitose por parte dos neutrófilos aumenta a sobrevivência dos espermatozoides viáveis em ambiente hostil e garante que uma quantidade suficiente de espermatozoides chega ao oviduto para uma fertilização eficaz (Troedsson, 2006).

5.4. Endometrose

A endometrose é uma situação degenerativa crónica do endométrio, por norma irreversível (Kenney, 1978). Esta patologia, considerada silenciosa, está associada à infertilidade e à idade da égua. A etiologia da endometrose permanece por esclarecer e não existe tratamento efetivo (Lehmann et al., 2011). Kenney (1978) definiu a endometrose como fibrose periglandular e/ou fibrose endometrial do estroma, podendo ser ativa ou inativa. O mesmo autor também relatou que glândulas isoladas ou em ninhos podem estar afetadas. O primeiro sinal de endometrose é a diferenciação morfológica e funcional atípica das células do estroma poligonais periglandulares que sintetizam fibras de colagénio denso. Quando existe lesão tecidular, a persistência de NETs pode conduzir a uma inflamação crónica, e, finalmente, a fibrose pela ativação de miofibroblastos (Chrysanthopoulou et al., 2014). Em fibroses avançadas, não ocorre síntese de colagénio, devido ao predomínio de miofibroblastos (Walter, Handler, Reifinger, & Aurich, 2001). A elastase (ELA) é um componente dos NETs que regula

a fibrose e a produção de prostaglandina (PG) (Amaral et al., 2018). A PGE₂ tem ação anti-fibróticas, enquanto a PGF_{2α} pode induzir fibrose (Olman, 2009). Rebordão et al. (2018) mostraram que a ELA aumenta a produção de colagénio tipo I, in vitro. Um estudo recente mostrou que a inibição da ELA provoca uma diminuição da síntese de colagénio tipo I, e consequentemente reduz a fibrose endometrial (Amaral et al., 2018).

Hoffmann (2006) utilizando imunohistoquímica, caracterizou a endometrose equina por uma deficiência nos recetores de hormonas esteroides e nos padrões de expressão de proteínas secretoras. A uterocalcina, a uteroglobina e a uteroferrina são algumas das proteínas cuja secreção está comprometida nas éguas com endometrose, sugerindo que esta pode ser uma das causas da reduzida fertilidade. O carácter progressivo da doença deve-se ao aumento de miofibroblastos, conduzindo à destruição glandular e consequente fibrose das glândulas (Hoffmann, 2006). A classificação da gravida da endometrose é feita com base no grau de fibrose encontrado no endométrio (Lehmann et al. 2011, Kenney & Doig 1986). Em 1999, Troedsson afirmou que esta patologia era típica de éguas múltiparas. Mais tarde, Lehmann et al. (2011) realizaram um estudo em que contrariaram essa afirmação, mostrando que não existe relação entre a evolução da endometrose e o número de partos da égua. Hoffmann em 2006, constatou que em éguas alfeiras, era mais frequentemente encontrada a forma de endometrose moderada destrutiva, categoria III, quando em comparação com éguas paridas. Neste mesmo estudo, Hoffmann constatou que existe uma relação entre éguas com endometrose e angioesclerose. O endométrio equino com endometrose, aparentemente é incapaz de produzir histotrofo suficiente, resultando na perda do embrião (Lehmann et al. 2011).

6. Diagnóstico de endometrite

A endometrite está entre os problemas médicos mais comuns em equinos adultos e pressupõe uma história de insucesso reprodutivo da égua. Existem diversos meios auxiliares de diagnóstico, cada um com vantagens e desvantagens. A lavagem de baixo volume avalia uma extensão maior de superfície uterina, enquanto a zaragatoa apenas retira uma amostra focal podendo conduzir a falsos negativos (LeBlanc et al., 2007). Por outro lado, doenças crónicas degenerativas e inflamações profundas podem ser diagnosticados por biópsia, sendo este o “*gold standard*” (Leblanc, 2010).

6.1. Observação externa, palpação e ultrassonografia

Um exame físico geral deve ser sempre executado em conjunto com o exame reprodutivo, de modo a recolher a maior quantidade de informação possível, garantindo com maior certeza que a égua será capaz de levar uma gestação a termo (McCue, 2008). Uma abordagem em casos de infertilidade de éguas é analisar a predisposição de fatores no trato reprodutivo em relação à ordem cronológica. Estes fatores são variáveis entre éguas jovens e virgens e éguas

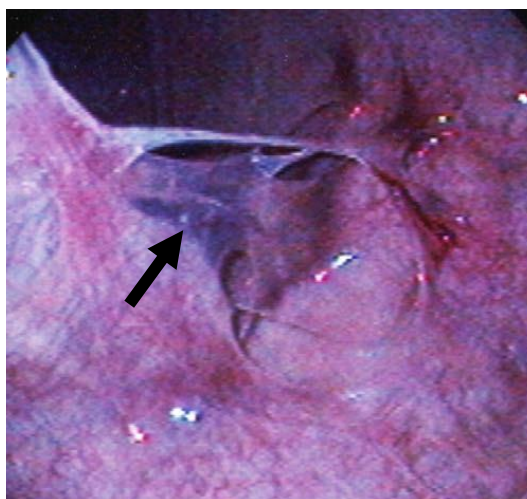
múltiparas. As alterações na anatomia reprodutiva externa sugerem falta de integridade da primeira barreira de defesa da égua e consequentemente maior probabilidade de patologia uterina (McCue, 2008). Foi observado que éguas jovens, durante a carreira desportiva, ao atingirem um alto nível de condição corporal atlética e consequente, perda de gordura corporal na área perineal, o reto desloca-se anteriormente e a vulva toma uma posição inclinada. Esta alteração na conformação permite a entrada de contaminantes fecais na vulva e vestíbulo. A conformação perineal pode ser uma característica hereditável (Pascoe, 1978). Um exemplo de alteração facilmente constatável é o som de entrada de ar quando separados os lábios da vulva, sendo indicativo de pneumovagina (Brinsko et al. 2011; LeBlanc & McKinnon 2011). Éguas com endometrite podem apresentar um corrimento vulvar, o que, no entanto, é um acontecimento raro se a endometrite for de menor amplitude ou crônica. Quando executada a palpação vaginal é possível detetar adesões cervicais assim como eventuais traumatismos no cérvix (McCue, 2008). A presença de mucosa hiperêmica, de descargas através do cérvix, de urina acumulada na vagina ou a presença de resíduos, como fezes, visualizados ao exame com espéculo, são sinais anormais e que indicam que existe uma predisposição à endometrite (Brinsko et al. 2011). Antes do uso da ultrassonografia era difícil detetar líquido intrauterino e as suas características, contudo, com a introdução deste método rotineiro de diagnóstico é possível determinar as características e a quantidade do fluido presente (Liu et al. 2008). Segundo Pycock (2011), o líquido uterino, à imagem ecográfica pode ser classificado de grau I a IV, sendo o grau I um fluido anecogénico, o grau II hipoecogénico com algumas partículas hiperecogénicas, o grau III moderadamente ecogénico e o grau IV um fluido hiperecogénico, sendo que quanto mais ecogénico for o fluido, maior será a contaminação por detritos. O grau de severidade da endometrite não pode ser extrapolado da imagem ecográfica do seu líquido, uma vez que exsudados purulentos, podem não apresentar a ecogenicidade esperada e serem subestimados (Pycock 2011). A ecografia também permite detetar alterações na parede uterina, nomeadamente sinais degenerativos (LeBlanc & McKinnon 2011). As anormalias ecográficas que estão associadas à diminuição da taxa de gestação, são: um edema excessivo pré ou pós IA, um edema que não se estende pela parede uterina ou a presença de linhas hiperecoicas entre as paredes uterinas, que indicam a presença de ar ou exsudado (Leblanc, 2010).

6.2. Endoscopia do lúmen uterino (histeroscopia)

Esta técnica permite uma visualização direta do lúmen uterino, utilizando um endoscópio. O endoscópio é utilizado para detetar adesões intrauterinas, quistos, retenção de cálices endometriais, lesões focais e corpos estranhos (Bracher, Mathias, & Allen, 1992). A maioria das condições que afetam o útero, tais como inflamação, infeção e fibrose podem ser diagnosticadas com uma combinação de ecografia, citologia, cultura e biopsia. No entanto, as

adesões uterinas são difíceis de diagnosticar com outro método que não a endoscopia do lúmen uterino (McCue, 2008).

Figura 5 – Endoscopia uterina. Adaptada de (McCue, 2008)



Legenda: Adesões intrauterinas visualizadas através de endoscopia (seta preta).

6.3. Biópsia uterina

Os primeiros registros de avaliações histológicas do endométrio em éguas remontam ao ano de 1928 (Dimock, 1928). Com a evolução do material e das técnicas, a biópsia é hoje em dia um método bastante utilizado para predição da infertilidade, a sua causa e prognóstico. Segundo Kenney (1978) o útero da égua é composto por três camadas: a camada interna, o endométrio; a camada média composta pelo miométrio; a camada externa, o perimétrio. O endométrio ou lúmen uterino é revestido por células epiteliais, que podem variar o formato de cúbicas a cilíndricas dependendo da altura do ciclo. A biópsia uterina, é o meio mais indicado para observar e avaliar a integridade estrutural do endométrio, a distribuição e severidade dos processos inflamatórios, mudanças fibróticas e dilatação de glândulas endometriais e vasos linfáticos (Overbeck, Witte, & Heuwieser, 2011), sendo o único meio de diagnóstico que pode ser preditivo da fertilidade (Leblanc & Causey, 2009). A biópsia uterina é indicada para constatar alterações do trato genital quando se verifica infertilidade após cobertura ou IA, com sêmen de qualidade comprovada, em mais de três ciclos, numa época reprodutiva. É também utilizada em éguas com histórico de perda embrionária precoce ou aborto, em casos em que se identifica comportamento de anestro durante a estação reprodutiva, em casos de piômetras e para avaliação de fertilidade (Kenney, 1978). As amostras de biópsias endometriais podem ser utilizadas para cultura, citologia e RT-PCR para identificação microbiana (Dascanio & McCue, 2014).

A amostra deve ser colhida durante a estação reprodutiva, preferencialmente no início do estro, devendo ter um tamanho adequado (20x3x3 mm). Deve ser registrada a altura do ciclo e transmitida ao patologista que vai avaliar a amostra. Deve ainda ser notificado o dono que

a égua pode ter alguma descarga sanguinolenta nas vinte e quatro horas que se seguem à biópsia (Kenney & Doig 1986; Descanio & McCue, 2014). As amostras são colhidas através de uma pinça de biópsia esterilizada, que atravessa o cérvix até ao lúmen uterino. Seguidamente o operador, através do reto, conduz a pinça de biópsia para o local pretendido, se for necessária mais precisão pode ser utilizada a sonda de ultrassonografia. As mandíbulas da pinça são abertas e o endométrio pressionado para o meio das mandíbulas, que se fecham quando a amostra está no local. Depois de fechado, o instrumento de biópsia é retirado e a amostra é avaliada macroscopicamente quanto à consistência e tamanho, sendo colocada num meio apropriado (Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011; Buczkowska et al., 2014). A amostra deve ser posteriormente fixada em formaldeído a 10%, solução de Bouin ou solução de Davidson. Seguidamente a amostra é incorporada em parafina e corada. A coloração *standard* é a hematoxilina-eosina. Existem outras colorações mais específicas como o Tricrómio de Masson e o Picrosirius Red que são utilizados para a identificação e quantificação da fibrose endometrial. A coloração de Gomori metenamina de prata (GMS) e acid-Schiff (PAS) são utilizadas para distinguir fungos e leveduras nas biópsias (Snider, Sepoy, & Holyoak, 2011; Brinsko & Sertich, 2014). Técnicas como morfometria de tecidos, rt-PCR, ELISA e técnicas de hibridação *in situ*, têm sido desenvolvidas e podem vir a aprofundar os dados quantitativos recolhidos a partir das biópsias (Brinsko & Sertich, 2014). Os pontos menos positivos desta técnica prendem-se com o facto de ser invasiva, necessitar de equipamento específico estéril, processamento adicional das amostras e de um especialista para fazer a avaliação (Nielsen, 2005; Overbeck et al., 2011). A única contraindicação conhecida deste procedimento é a sua utilização em éguas gestantes, pois há o risco de rutura das membranas fetais e de libertação de PGF2 α (Love, 2011).

Kenney & Doig (1986) categorizaram as biópsias endometriais e inferiram sobre o prognóstico de fertilidade esperado para cada uma das categorias. O endométrio é classificado numa escala de I a III. A escala I representa endométrios normais, com mínima inflamação e fibrose. A categoria II é dividida em duas subcategorias, IIa e IIb, e compreende os endométrios classificados entre a escala I e III (Descanio & McCue, 2014).

Tabela 2 – Classificação de biópsias quanto a alterações e taxa de parto esperada. Adaptado de Kenney e Doig (1986).

Categoria	Grau de alterações endometriais	Taxa de parto esperada (%)
I	Ausente	80-90
IIa	Ligeiro	50-80
IIb	Moderado	10-50
III	Severo	<10

As características da biópsia variam com a época reprodutiva e com o ciclo, sendo que as glândulas estão inativas durante o anestro e as células luminais e glandulares têm forma cuboide. Durante o estro, as células são colunares e existe edema na lâmina própria, enquanto no diestro, o epitélio varia de colunar a cuboide, não há presença de edema e os ramos glandulares estão tortuosos (Descanio & McCue, 2014). Ferreira-Dias, Nequin e King (1999) utilizando um microscópio electrónico de transmissão, verificaram que o endométrio tipo III apresenta células com maior degeneração, com poucos organelos e células sem cílios no lúmen uterino. Os tecidos desta categoria apresentam uma extensa fibrose e elevado número de células inflamatórias. A presença de neutrófilos no endométrio é utilizada como um indicador de endometrite aguda. Nos casos crónicos, existe uma predominância de células mononucleares (Overbeck et al., 2011; Kilgenstein et al., 2015). A doença degenerativa mais importante de endometrite equina é a fibrose periglandular, esta doença está associada a alterações morfológicas e funcionais das glândulas endometriais afetadas. Esta alteração é classificada como não inflamatória e denominada endometrite crónica degenerativa (Kilgenstein et al., 2015). Outras alterações degenerativas detetadas na avaliação de uma biópsia incluem a dilatação cística das glândulas ou necrose glandular. Ao contrário do que acontece nos casos de inflamação, a fibrose representa uma alteração permanente e sem resolução clínica (Descanio & McCue, 2014). A biópsia tem valor adicional sobre a potencial causa da patologia endometrial quando, em conjunto se realiza citologia, cultura, ultrassonografia e exame visual externo e através de um espéculo. Foi demonstrado que a citologia e microbiologia realizadas a partir desta técnica são superiores em termos de sensibilidade e de valor preditivo positivo (Nielsen et al., 2010). No caso de infeções por fungos, a biópsia pode ser bastante útil a detetar formas invasivas, através da utilização de uma coloração prata, onde os fungos aparecem corados de preto ou cinzento (Descanio et al., 2000). Num estudo realizado por Petersen, Nielsen, Lehn-Jensen e Bojesen (2009) foi demonstrado, através da hibridização fluorescente in situ, que o *S.zooepidemicus* reside em profundidade no endométrio em éguas com infeção crónica, o que pode explicar o maior número de resultados de cultura positivos a este agente através de amostras recolhidas por biópsia. A biópsia uterina demonstrou ser o melhor método de deteção desta bactéria uma vez que recolhe amostras endometriais em maior profundidade (Petersen et al., 2015).

6.4. Citologia uterina

A citologia é o estudo das células de revestimento uterino e das células exfoliadas para o lúmen do útero (Digby, 1978). A citologia endometrial é uma das técnicas de diagnóstico de endometrites mais utilizadas, sendo um método fácil, rápido e económico (Kozdrowski et al., 2015). O diagnóstico pode basear-se inicialmente nos resultados citológicos, permitindo, por vezes, iniciar uma terapêutica imediata, mesmo antes dos resultados da cultura microbiológica. Contudo, é recomendado que sejam realizadas as duas análises,

complementando-se, e permitindo ter uma informação mais detalhada relativamente ao agente da endometrite (Riddle et al. 2007; Nielson et al. 2010; Overbeck et al. 2011). A citologia apenas dá informação se existe inflamação, a presença de cristais, fungos e por vezes bactérias. Riddle et al. em 2007, relatou que éguas com endometrite têm duas vezes mais citologias positivas do que culturas embora a citologia não detetar todos os casos de endometrite. Uma correlação entre os resultados destas duas técnicas nem sempre é evidente, o que pode ser explicado, por exemplo, pela utilização de as zaragotas uterinas que podem falhar na recolha de amostras de infeções locais, pela presença de antibióticos no útero, infeções muito profundas ou irritação não infecciosa do endométrio (Overbeck et al., 2011). Uma égua com cultura e citologia positivas pode, com bastante segurança, ser diagnosticada como tendo uma endometrite (LeBlanc et al. 2009). Os agentes patogénicos que estão associados a líquido intrauterino, costumam coincidir com a presença de neutrófilos na citologia, ao contrário dos que não estão associados à presença de líquido no lúmen, que normalmente estão associados a citologias negativas (Leblanc, 2010). A citologia tem imenso valor no diagnóstico de urovagina e de infeções fúngicas (Roszel & Freeman, 1988).

Figura 6 – Exemplos de zaragatoas e escovas citológicas. Adaptado de Ferris et al., 2015.



Legenda: Em cima uma zaragatoa simples com capa, no meio uma zaragatoa com dupla proteção e em baixo uma escova citológica.

As amostras uterinas podem ser recolhidas em qualquer fase do estro. A maioria das amostras são recolhidas no início do estro quando o cérvix se encontra aberto, a recolha é simples e o risco de infeção iatrogénica é mínima. A avaliação no início do estro, permite uma interpretação e instituição de terapêutica antes de a égua ovular. Se a amostra citológica necessitar de ser recolhida durante o diestro, devem ser administradas prostaglandinas após o exame, de modo a que a égua entre em estro, reduzindo assim o risco de infeção iatrogénica (Ferris et al., 2015). As opções disponíveis para recolher uma amostra citológica incluem a zaragatoa simples, sem proteção, que é colocadas através de um espéculo, a zaragatoa com dupla proteção, a escova citológica, a lavagem de baixo/alto volume e a biópsia uterina. A zaragatoa com dupla proteção e a escova uterina (Figura 6) fornecem amostras com boa celularidade e poucos artefactos (Overbeck et al., 2011). De modo a utilizar apenas uma zaragatoa ou escova citológica, a amostra deve ser em primeiro lugar distribuída sobre uma lâmina estéril e só depois realizada a cultura (Ferris et al., 2015). Alguns profissionais preferem

utilizar uma zaragatoa simples com capa de proteção (figura 6), contudo existe potencial de contaminação da citologia com células ou detritos do cérvix e da vagina. Outra hipótese é a utilização de um espéculo estéril para a passagem da zaragatoa ou escova, esta técnica torna-se complicada em éguas com episioplastias (Ricketts, 2011). Uma das limitações da utilização de zaragatoas ou escovas citológicas é a amostra ser recolhida de uma pequena parte da superfície uterina que pode não ser representativa (Ferris et al., 2015). Comparando amostras recolhidas do lúmen uterino (citologia) e do endométrio (histologia), são identificadas duas vezes mais éguas com neutrófilos na histologia (Møller Nielsen, Høgsberg Nielsen, & Rønn Petersen, 2012).

A lavagem de baixo ou alto volume permite recolher uma amostra homogênea do lúmen uterino e, para além de células, tem a capacidade de recolher muco e/ou exsudado (Ball, Shin, Patten, Lein, & Woods, 1988; LeBlanc et al., 2007). O líquido recolhido é colocado em dois tubos cónicos de 50ml e centrifugados a 400rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante é retirado e o *pellet* coletado com uma zaragatoa estéril para um par de lâminas. Se o *pellet* for muito denso, pode ser ressuspenso e posteriormente distribuído numa lâmina de vidro (Cocchia et al., 2012). As citologias em que a amostra foi recolhida por lavagem de baixo ou alto volume apresentam artefactos celulares, como células roturadas, resultado do processo de centrifugação (Ferris et al., 2015), no entanto, um estudo recente (Bohn et al., 2014), demonstrou que as técnicas de processamento da lavagem de baixo volume não têm influência na qualidade de diagnóstico citológico. Não obstante, a lavagem provoca alguma irritação de endométrio (LeBlanc & McKinnon et al. 2011; Cocchia et al. 2012).

É aconselhado preparar duas lâminas por amostra, cada lâmina deve ser identificada, seca ao ar e posteriormente corada com azul-de-metileno ou Wright Giemsa modificado (Diff-Quik®) (Ferris et al., 2015).

6.4.1. Interpretação de citologias

A avaliação de uma citologia deve ser minuciosa e sistemática. Uma avaliação inicial deve ser feita em pequena ampliação (4x ou 10x) para determinar se a celularidade é adequada. De modo a verificar a qualidade da amostra deve ser observado o conteúdo do fundo do esfregaço, considerando a quantidade de células intactas, distorcidas ou fragmentadas, a quantidade de detritos, contaminantes e mucoproteínas presentes. Um esfregaço é considerado de boa qualidade quando há preservação das células e é possível o seu reconhecimento individual. A qualidade é moderada quando há presença de detritos no fundo da lâmina, poucas células rebentadas e poucos amontoados de células. É classificado como de fraca qualidade quando existem uma grande prevalência de células distorcidas, sendo difícil a sua distinção individual (Defontis, Vaillancourt & Grand, 2011). Se a celularidade não

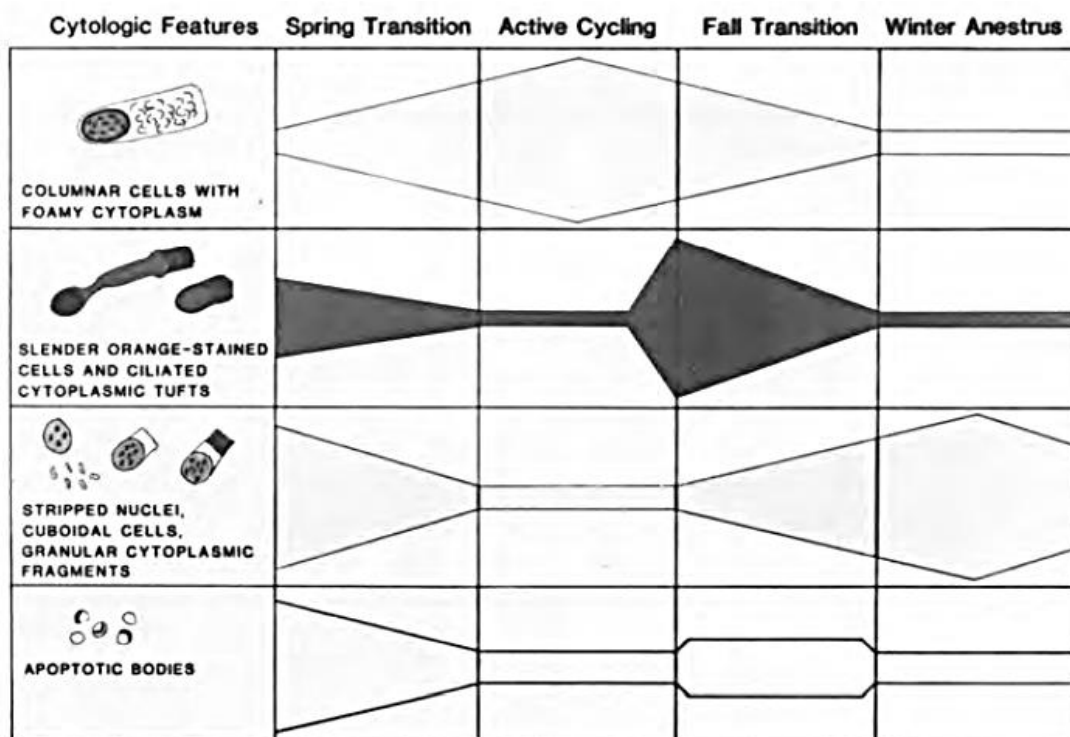
foi satisfatória deve ser recolhida uma nova amostra. Se a amostra for de qualidade deve ser avaliada então na ampliação de 400x (10x ocular x 40x objetiva).

Na citologia são avaliadas as células uterinas, leucócitos, detritos, eritrócitos, bactérias, leveduras e fungos e espermatozoides. Por vezes é necessária a avaliação na ampliação 1000x (10x ocular x 100x ocular com óleo de imersão) para confirmar a presença de bactérias e fungos (Ferris et al., 2015). Após a celularidade ser classificada como adequada, a citologia é avaliada quanto à presença de inflamação ou outras anormalidades. A presença de células inflamatórias, não representa necessariamente uma infeção uterina, a inflamação pode ter origem num pneumóuterio, no refluxo de urina para o útero, após IA ou cobertura, derivada a lavagem ou infusões uterinas (Roszel & Freeman, 1988). Uma cultura positiva nem sempre é acompanhada de uma citologia positiva (LeBlanc et al. 2009). Overbeck, Jäger, Schoon, e Witte (2013) comprovaram que amostras histológicas e citológicas recolhidas do mesmo local do endométrio apresentam o mesmo número de PMNs. Quando as amostras eram recolhidas em locais diferentes, utilizando sempre os dois métodos em cada local, no mesmo momento, o número de PMNs apresentava variações significativas.

6.4.1.1 Células uterinas epiteliais

As células epiteliais uterinas variam de cubóides no anestro, a colunar altas durante o estro (Roszel & Freeman, 1988; LeBlanc et al. 2009; Ferris et al., 2015). No anestro a citologia apresenta células uterinas cubóides, em grupos coesos. É possível observar fragmentos granulares citoplasmáticos e alguns macrófagos. Durante a época de transição da primavera, a citologia apresenta uma destruição celular característica que acontece em resposta à alteração hormonal. Durante esta fase, as células epiteliais passam de cubóides a cilíndricas, com um núcleo levemente esponjoso, enquanto os corpos apoptóticos diminuem (Roszel & Freeman, 1988). Durante a época de reprodução as células encontram-se ativas, apresentando um núcleo oval e basilar, podendo conter pequenos vacúolos. A maioria das células são colunares durante o estro. Quando a égua entra no período de transição, no final da época de reprodução, as citologias são caracterizadas por células longas, cilíndricas com núcleos picnóticos (Roszel & Freeman, 1988). A maioria das células uterinas são não ciliadas, mas, por vezes, é possível observar estas células na citologia. As células epiteliais escamosas são raras e normalmente só estão presentes em éguas pós parto ou em éguas com refluxo de urina para o útero (Couto & Hughes, 1984). As células epiteliais escamosas, são uma evidência típica de contaminação vaginal (Ferris et al., 2015).

Figura 7 – Características citológicas do endométrio equino, com as variações anuais do trato reprodutivo. Adaptado de Roszel e Freeman, 1988.

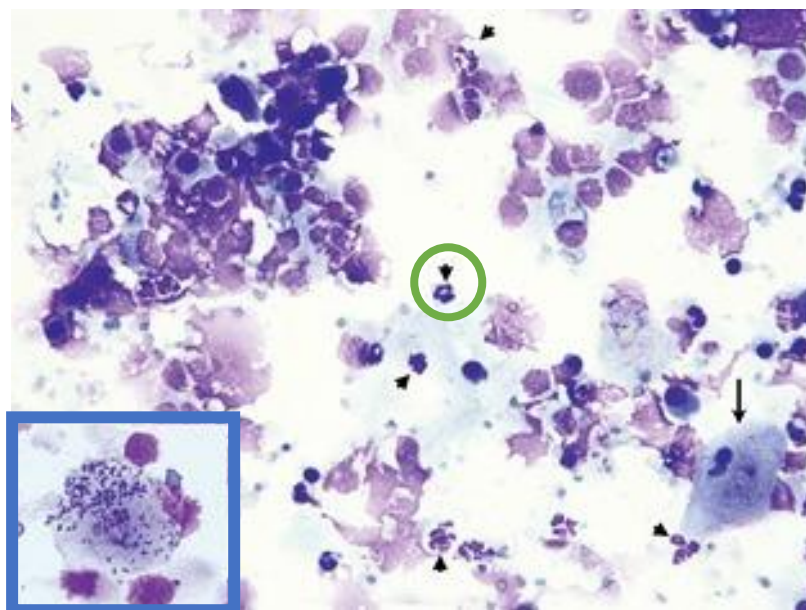


6.4.1.2 Leucócitos

Os neutrófilos, são os leucócitos predominantes em citologias uterinas. Os neutrófilos têm um único núcleo que pode estar dividido entre 3-5 lóbulos. A citologia de uma égua normal em estro deve apresentar neutrófilos raros, mas podem ser identificados numa amostra contaminada com sangue durante a colheita, sem que seja indicador de inflamação uterina. Os neutrófilos podem estar presentes no lúmen após IA ou cobrição (Card, 2005), após lavagem uterina, infusão, infecção e durante o período pós parto (Ferris et al., 2015).

Outros leucócitos como os macrófagos, linfócitos ou eosinófilos não são frequentemente encontrados. Os linfócitos e os macrófagos são encontrados durante os primeiros dias pós-parto e em infecções uterinas crônicas. Os eosinófilos são encontrados em casos de pneumovagina, infecções fúngicas e refluxo de urina para o útero (Ferris et al., 2015).

Figura 8 – Preparação citológica recolhida por lavagem de baixo volume e concentrada por centrifugação, corada com Diff-Quik observada na objetiva 40x. Adaptada de Bohn et al., 2014.



Legenda: Preparações citológicas feitas a partir de lavagens de baixo volume concentradas por centrifugação apresentam muitas vezes as células uterinas roturadas, enquanto as células inflamatórias se mantêm intactas (setas pequenas e círculo verde). Células de escamação são ocasionalmente vistas (seta comprida e quadrado azul), muitas vezes associadas a bactérias.

A lâmina deve ser observada ao microscópio numa ampliação de 400x e registado o número de polimorfonuclear neutrófilos (PMNs) como uma percentagem das células observadas na lâmina. Um resultado positivo na citologia é indicador de endometrite aguda, mas não existe um consenso relativamente ao valor do limiar positivo indicativo de inflamação (Overbeck et al., 2011). Este varia entre diferentes autores, desde 0,5% a 5% (Card, 2005; Nielsen, 2005). Esta variação deve-se à existência de uma população de PMNs residentes no endométrio de éguas saudáveis durante o estro, o que é considerado fisiológico (Card, 2005). Um dos sistemas de classificação categoriza as amostras citológicas em não inflamatória (PMN <5%), inflamação ligeira (PMN 5-15%), inflamação moderada (PMN 15-30%) e inflamação grave (PMN >30%) (Card, 2005; Riddle et al., 2007; Cocchia et al., 2012). A quantidade de neutrófilos presente na citologia foi relacionada com a capacidade da égua em produzir um poldro vivo. A presença de $\geq 1\%$ de PMNs no total de células, tem significativamente um rácio de poldros vivos menor do que quando não se verifica a presença de PMNs (Morel, Lawlor, & Nash, 2013).

Outra forma de classificação da inflamação uterina, é contabilizando o número de leucócitos por campo, após avaliar dez campos, em diversas áreas da lâmina e no final calcular a média. É essencial que estes dez campos apresentem uma boa quantidade de células, garantindo

que se está a avaliar uma amostra de boa qualidade. A classificação é feita segundo a tabela 3, (Riddle et al., 2007).

Tabela 3 – Classificação citológica dos leucócitos em citologias realizadas a partir de amostras recolhidas por zaragatoa, escova citológica ou biópsia. Adaptado de Riddle et al. 2007.

Número de leucócitos por campo	Classificação
0-raro	Normal
1-2	Suave
3-5	Moderada
>5	Severa

Esta classificação não se aplica a amostras recolhidas por lavagem de baixo ou alto volume, pois estas amostras são concentradas pelo processo de centrifugação. Bohn et al., em 2014 classificou o grau de inflamação de amostras recolhidas por lavagem de baixo volume como mostra a tabela 4.

Tabela 4 – Classificação citológica dos leucócitos em citologias realizadas a partir de amostras recolhidas por lavagem de baixo ou alto volume. Adaptado de Bohn et al., 2014.

Número de leucócitos por campo 400x	Classificação
<1	Normal
>5-10	Suave
>10	Severa

Recentemente, foi sugerido que o método mais correto para avaliar uma citologia endometrial seria utilizar a percentagem de leucócitos em relação às células epiteliais (Kozdrowski et al., 2015). No referido estudo foi comparado o método de neutrófilos/hpf e uma contagem de 300 células e percentagem de neutrófilos na mesma. Foi concluído que existem mais éguas diagnosticadas com inflamação pelo método de contagem da percentagem de neutrófilos em 300 células (Kozdrowski et al., 2015).

6.4.1.3 Eritrócitos

Os eritrócitos são encontrados em pequena quantidade numa citologia uterina normal (<4/hpf). Uma quantidade excessiva de eritrócitos, indica irritação do endométrio por infecção, infusão de componentes agressivos ou técnica agressiva de recolha. Normalmente a contaminação com eritrócitos é comum quando se utiliza uma escova citológica como método de recolha da amostra (Ferris et al. 2015).

6.4.1.4 Bactérias

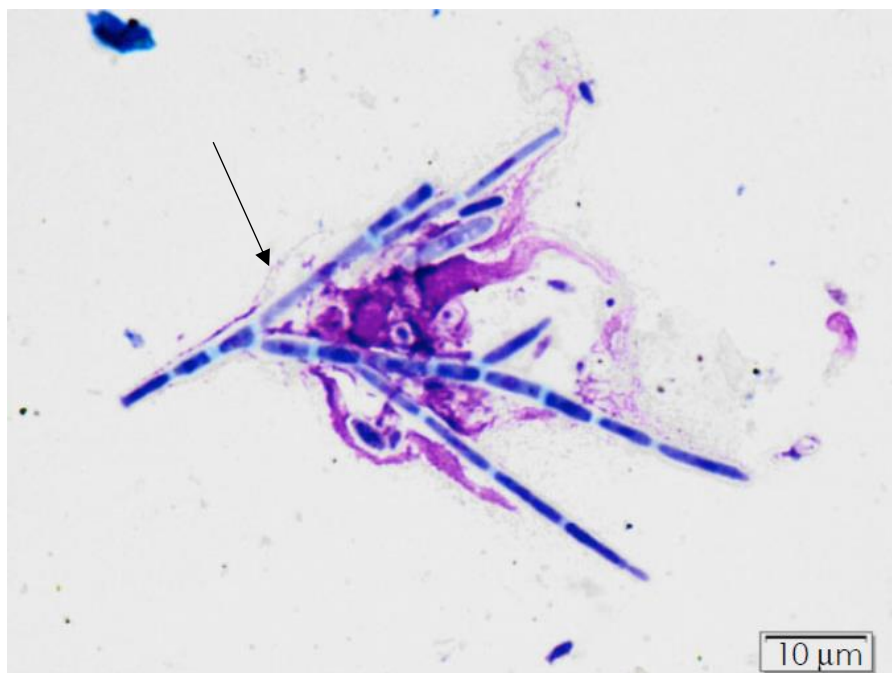
As bactérias podem ser visualizadas na citologia, mas apenas com a objetiva de 100x, de modo a diferenciar os microrganismos de possíveis detritos. A presença de bactérias e leucócitos, pode ajudar a determinar se a bactéria é um agente de endometrite ou se foi resultado de contaminação durante o processo de recolha ou coloração da amostra. É de notar que a cor da bactéria corada com Diff Quick® não é equivalente à coloração com a coloração de Gram, não permitindo distinguir Gram-positivas de Gram-negativas (Ferris et al., 2015). Os esfregaços podem ser fixados e corados com uma coloração de Gram, permitindo a diferenciação entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A presença de cocos Gram-positivos é consistente com uma infecção pela espécie *Streptococcus* β -hemolítica. Os bacilos Gram-negativos tipicamente isolados de éguas com endometrite incluem isolados da espécie *Escherichia coli* (*E.coli*), *Pseudomona aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Sertich, 2007). Riddle et al. em 2007 reportou que, na presença de uma endometrite causada por *Streptococcus equi* spp. *Zooepidemicus*, 65% dos casos apresentavam evidências de inflamação na citologia. Em contraste, na presença de *E.Coli* e *Pseudomona aeruginosa*, apenas 55% e 52% dos casos, respetivamente, eram acompanhados de citologia positiva.

6.3.1.5. Fungos e leveduras

As leveduras podem ser ovais ou esféricas e apresentam uma cápsula em volta. (figura 4). Menos frequentemente, aparecem fungos em forma de hifas no exame citológico (Figura 9), (Dascanio et al., 2000). Em muitos casos a identificação de endometrites fúngicas é feita apenas pela identificação de hifas, pseudo-hifas ou leveduras na citologia, uma vez que estes microrganismos nem sempre crescem na cultura (Ferris et al., 2015).

Figura 9 – Hifa (seta preta) observada com a ampliação de 100x com óleo de imersão. Adaptado de Ferris et al., 2015.



6.4.1.6 – Detritos

Os detritos normalmente são compostos por células epiteliais degeneradas, muco, material proteico e cristais da coloração. Os detritos devem ser classificados segundo a tabela 5. A presença de detritos na escala de moderado a grave tem sido associado com a presença de endometrite bacteriana. (Ferris et al., 2015)

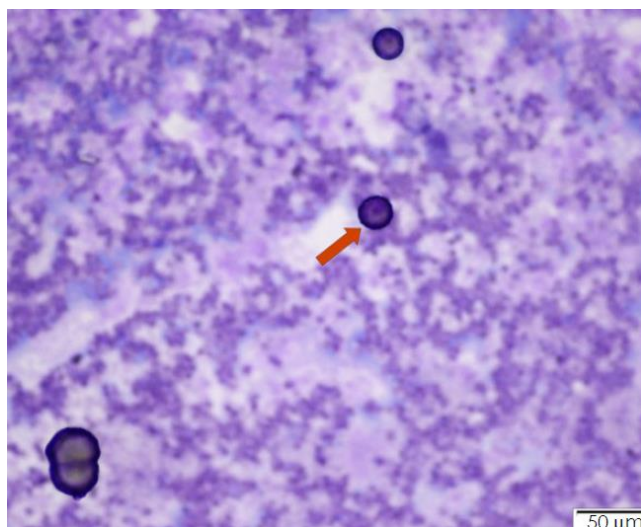
Tabela 5 – Classificação quanto aos detritos numa citologia. Adaptado de Ferris et al. 2015.

% de detritos	Classificação
<25%	Mínimo
25-50%	Suave
>50%	Moderado a grave

6.4.1.7 Cristais de urina

Os cristais de urina são encontrados em éguas com refluxo de urina para a vagina e útero.

Figura 10 – Citologia com cristais de urina (seta encarnada). Adaptado de Ferris et al., 2015.

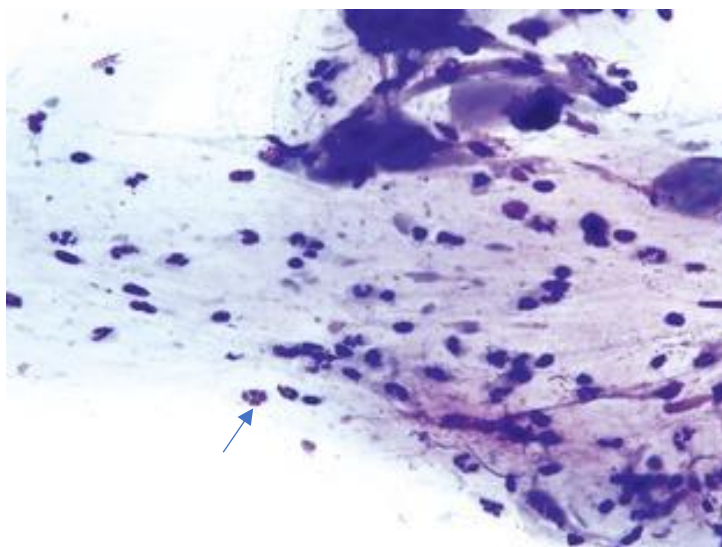


6.3.1.8. Muco

As glândulas uterinas contêm glicogénio, que é abundante durante a época de reprodução (Freeman, Roszel, Slusher, & Castro, 1990). O muco é composto por uma complexidade de secreções entre elas lactoferrina, lisozima e IgA. Estas substâncias são importantes nas interações bacterianas com as células, competição por ligações com ferro e proteção da superfície da mucosa (Clamp, 1977). Foi a presença ocasional de células ciliadas nas citologias uterinas que sugeriu a hipótese de que o muco estaria correlacionado com a limpeza uterina (Causey, 2007). As células produtoras de muco podem aumentar, diminuir ou sofrer metaplasia em resultado de doença (Clamp, 1977).

Foi estabelecido que as secreções uterinas de éguas suscetíveis a endometrite crónica, são diferentes das de éguas normais e esta diferença pode interferir com a opsonização do agente infeccioso (Clamp, 1977; Causey, 2007). Roszel & Freeman em 1988, descreveram um aumento de células uterinas secretoras, nas citologias uterinas, em resposta a urovagina e fenómenos irritativos.

Figura 11 – Citologia preparada a partir de uma amostra recolhida por zaragatoa. Corada com Diff-quick, observada na objetiva de 40x. Adaptado de Bohn et al., 2014.



Legenda: É possível observar um número moderado de células inflamatórias (seta azul) embebidas em muco limpo.

6.4.2. Obtenção de amostras

6.4.2.1 Zaragatoa

A zaragatoa uterina é das técnicas mais utilizadas na prática clínica rotineira, devido aos baixos custos, facilidade e segurança da recolha a que está associada (Overbeck et al., 2011). A zaragatoa com dupla proteção implica o uso de uma dupla bainha de revestimento, o que reduz a contaminação pela genitália externa e vagina, garantindo assim uma amostra exclusivamente uterina. Esta técnica associada à identificação de neutrófilos na citologia veio reduzir o número de éguas tratadas inapropriadamente. No entanto, nem todas as éguas com endometrite são identificadas, uma vez que a zaragatoa apenas contacta com 1-2cm de área uterina, tendo uma capacidade limitada na recolha da amostra (LeBlanc et al., 2007). Neilsen (2005) recentemente reportou que apenas 38 de 84 éguas (45%) com bactérias isoladas a partir da biópsia, tinham bactérias isoladas a partir da zaragatoa. Neste estudo a sensibilidade de identificação de bactérias a partir de uma zaragatoa uterina foi de 0.34, enquanto a especificidade foi de 1.0 quando foi utilizada a presença de neutrófilos para a identificação de endometrite. Estudos recentes indicam que as zaragatoas uterinas têm menos sensibilidade para detetar gram-negativos do que as lavagens de baixo volume e biópsias (Leblanc, 2010).

Esta técnica consiste na condução da zaragatoa através da vulva, passando a vagina em direção ao cérvix. A bainha interior da zaragatoa é introduzida através do cérvix, em direção ao lúmen do útero, onde é transposta a proteção e a zaragatoa fica em contacto com o lúmen uterino. Quando no lúmen uterino, são executados movimentos rotacionais repetidos na parede do útero e em diferentes direções, durante 30-60 segundos (Nielson, 2005; Defontis,

Vaillancourt & Grand, 2011; Cochia et al. 2012). É imperioso que a força feita durante a rotação seja moderada, evitando que a zaragatoa se parta (Descanio, 2014). A zaragatoa é retraída para a proteção interior e de seguida para a proteção exterior, evitando a sua contaminação (Nielsen, 2005; Cocchia et al., 2012). As culturas feitas com amostras recolhidas por zaragatoa, devem ser imediatamente processadas, e se for necessário transportar para um laboratório deve ser colocada em meio próprio e refrigerada (Descanio, 2014).

Uma desvantagem desta técnica de recolha de amostras uterinas é a prevalência de células distorcidas na citologia, que é dependente da pressão aplicada na realização do esfregaço, pois as células aderem às fibras de algodão da zaragatoa. Adicionalmente, o número total de células é reduzido em consequência da pequena área da superfície endometrial que contacta com a zaragatoa (Cocchia et al., 2012). Este método pode levar a falsos negativos, uma vez que a amostra é apenas de uma zona do endométrio e, por isso, as infeções focais, profundas ou produtoras de biofilmes podem não ser detetadas. Outra condicionante da técnica é a dificuldade em alcançar a região mais pendular do útero, onde é de esperar uma maior quantidade de microrganismos (Overbeck et al., 2011).

6.4.2.2. Lavagem de baixo ou alto volume

Tipicamente são utilizadas zaragatoas ou escovas uterinas para obter amostras uterinas para cultura. No entanto, a lavagem de baixo volume é mais representativa nas situações em que as infeções são localizadas e tem sido utilizada como alternativa a outras técnicas (Ball et al., 1988; Descanio & McCue, 2014). Foi demonstrado que as culturas de lavagens uterinas têm o dobro da sensibilidade das culturas a partir de zaragatoas uterinas (Nielsen, 2005; LeBlanc et al., 2007). Este aumento na frequência de diagnóstico de endometrite a partir de lavagens uterinas é mais evidente em casos subclínicos (LeBlanc et al., 2007).

Os aspetos negativos desta técnica são: o tempo despendido no procedimento, a possibilidade de contaminação iatrogénica pelo tubo de lavagem não protegido, a necessidade de tubos de lavagem esterilizados e o passo o da centrifugação durante do processamento. Alguns dos pontos referidos aumentam o risco de resultados falsos positivos. A centrifugação, para além de aumentar o tempo entre a recolha e a realização da citologia, pode comprometer a qualidade da mesma, pois o processo rutura das células uterinas (Descanio, 2014; LeBlanc et al., 2007). Uma vez que a flora vaginal e da genitália podem ser fontes de contaminação, devem ser tidos em consideração outros indicadores de inflamação como o pH, presença de neutrófilos e detritos. Estes indicadores auxiliam na identificação de falsos positivos (LeBlanc et al., 2007). Christoffersen et al., 2015, recentemente desenvolveu uma técnica de lavagem uterina de baixo volume com dupla proteção, com maior sensibilidade

e especificidade, diminuindo o risco de contaminação. É uma boa alternativa à técnica de lavagem uterina convencional.

O procedimento consiste na realização de uma lavagem uterina, em que são colocados no lúmen uterino entre 60 a 120 mL de uma solução estéril de Lactato de Ringer (LR), de tampão fosfato salino (PBS) ou de soro fisiológico, através de uma seringa ou um saco adaptado à extremidade de um cateter de lavagem uterina ou de uma pipeta de inseminação. Após colocar a totalidade de volume de solução no útero, o operador deve realizar uma massagem transretal dos cornos uterinos durante aproximadamente 30 segundos, ou simplesmente aguardar durante 2 minutos para que o fluido se distribua uniformemente pelo útero (Amorim et al. 2015). O fluido é então drenado para a seringa ou saco estéreis por sucção ou pela gravidade e transferido para um tubo de Falcon estéril (50 mL) (Cocchia et al. 2012).

Sikora et al. (2016) descreveu como alternativa uma lavagem uterina de alto volume (1L), em que é aproveitado o fluido da lavagem uterina realizada como tratamento. Este procedimento consiste na utilização de 1L de uma solução estéril de LR ou de uma solução estéril salina tamponada, adaptada a uma sonda de lavagem uterina. O fluido é introduzido no lúmen uterino pelo método de lavagem uterina convencional e posteriormente removido por gravidade para a mesma garrafa. Seguidamente é desinfetada uma zona da garrafa de onde serão aspirados 50 mL para um tubo, através de uma agulha estéril. Este é um método eficaz de recolha de amostras para avaliação microbiológica e citológica.

Em qualquer uma das técnicas é importante verificar se foi recuperado volume suficiente para ser utilizado como diagnóstico. O fluido é avaliado macroscopicamente em relação à transparência e quantidade de muco presente. Este é classificado em transparente, turvo ou transparente com muco (Descanio, 2014). O muco e turvação estão relacionados com a presença de *E.coli* e *Streptococcus* β -hemolítico (LeBlanc et al., 2007).

O fluido recolhido é centrifugado e o sobrenadante é eliminado com uma pipeta ou decantado, sendo o pellet dividido em duas partes. Uma para cultura microbiológica e outra é ressuspendida num mililitro de sobrenadante e com uma gota é realizado um esfregaço citológico. Alternativamente, para avaliação citológica, pode ser realizado um esfregaço com zaragatoa numa lâmina de microscópio (Card, 2005; Cocchia et al., 2012; LeBlanc et al., 2007).

A técnica de lavagem de baixo ou alto volume apresenta maior número de células distorcidas e roturadas do que a técnica em que é utilizada uma escova citológica, sendo relevante o tempo entre a colheita da amostra e a realização do esfregaço, influenciando a qualidade do mesmo. Como a amostra é centrifugada, existe uma acumulação de mucoproteínas e detritos, o que pode dificultar a visualização e identificação de células.

Devido à manipulação transretal e ao atrito causado pela ponta da sonda de lavagem, podem ser encontrados alguns eritrócitos na citologia (Cocchia et al., 2012).

7. Microbiologia

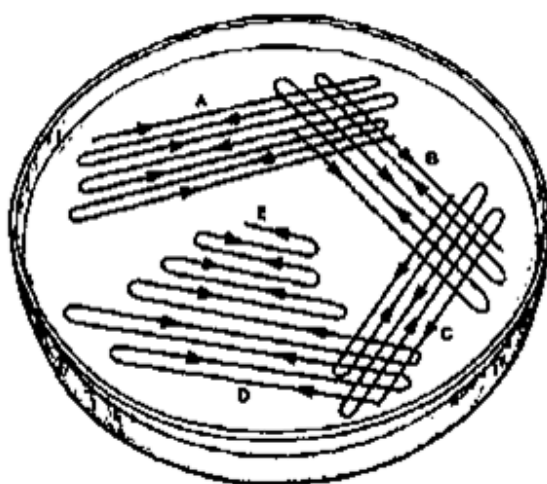
Os sinais de endometrite incluem líquido intrauterino, edema excessivo, descargas vaginais, ciclos éstricos anormais e vaginites. Os testes microbiológicos utilizando placas de identificação presuntiva permitem uma rápida identificação dos agentes infecciosos causadores de endometrites e conseqüentemente uma rápida implementação de tratamento (McCue & Bishop, 2014). Existem vários fatores de risco como a idade, conformação vulvar, defeitos na contratilidade vulvar, atrasos na limpeza uterina, cultura positiva antes da IA, útero pendular e retenção de fluidos (Christoffersen et al., 2015). Quando se verificam citologias e culturas endometriais positivas, existem fortes indicadores de endometrite, contudo, alguns testes diagnósticos podem ser negativos em casos subclínicos (Leblanc & Causey, 2009).

As bactérias mais frequentemente isoladas são: *Streptococcus* β -hemolítico, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Riddle, LeBlanc & Stromberg, 2007; Wittenbrink & Hoelzle, 2008). Algumas bactérias como *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, e alguns fungos e leveduras são conhecidos por formarem biofilmes, resultando em infecções crônicas focais e persistentes, sendo muitas vezes associados a culturas e citologias negativas (Leblanc & Causey, 2009; Beehan et al., 2015). Albiñ e co-autores (2003) descreveram uma correlação significativa, entre a identificação de *E.coli* em zaragatoas e inseminações repetidas em éguas que não apresentam sintomas clínicos. Os agentes identificados nos exames microbiológicos podem ser influenciados pelo modo de reprodução praticada, pela técnica utilizada na recolha da amostra, pelo tempo entre a recolha da amostra e o processamento e pelo manuseio (Albiñ et al. 2003). Culturas falso-positivas estão associadas com a contaminação do instrumento de recolha da amostra pelo ambiente, genitália externa ou vagina, enquanto que os falsos-negativos são devido a recolha inadequada de amostra (LeBlanc et al., 2007). Contudo, a colheita de uma amostra para cultura durante o estro pode resultar em 31% de culturas positivas em éguas normais de organismos não patogênicos (Hinrichs, Cummings, Sertich & Kenny, 1998).

Para que seja realizado um exame microbiológico a amostra uterina pode ser recolhida por zaragatoa, escova citológica, lavagem de baixo/alto volume ou biópsia. A cultura endometrial de biópsias e lavagens uterinas são métodos mais sensíveis para identificar *E.coli* do que a cultura por zaragatoa. A zaragatoa permite uma identificação em duas vezes mais éguas com inflamação aguda através da análise citológica do que por cultura microbiológica (Leblanc, 2010). A amostra é então aplicada num meio de cultura, que pode variar consoante o objetivo da cultura ou método de trabalho. Algumas das opções dos diferentes meios de cultura são: uma placa de agar individual, duas placas, uma de agar para TSA e outra com MacConkey II agar, ou numa placa dividida com estes dois meios. O meio MacConkey II agar é específico para bactérias gram negativas. Outra alternativa é a cultura em meio cromogénico (CHROMagar® ou Chromid CPSE elite®) onde cada bactéria e alguns fungos crescem com uma cor específica. Outra opção é aplicar a amostra num agar específico para o crescimento de

fungos, inibindo o desenvolvimento de bactérias, um exemplo deste tipo de meios é o Sabouraud, o tempo de incubação é de dois dias a quatro semanas (McCue & Bishop, 2014). Os fungos levam mais tempo a crescer que as bactérias, e se não for requerida a pesquisa destes agentes, podem muitas vezes não identificados (Dascanio et al., 2000). O diagnóstico de endometrite fúngica é normalmente feito pela associação de cultura aeróbia e citologia das secreções uterinas. A cultura é por vezes insuficiente para confirmar a presença de fungos, deve ser detetada a presença de leveduras, pseudo-hifas ou hifas e sinais de inflamação na citologia ou na biópsia (Dascanio et al., 2000). A metodologia da técnica de cultura consiste em remover a placa do local de refrigeração e deixar que esta atinja a temperatura ambiente. Identificar a placa com o nome da égua, data e modo de recolha da amostra. A amostra deve ser semeada pela técnica de esgotamento por estrias como está ilustrado na Figura 12. As placas devem ser incubadas a 37°C durante 24 horas (McCue & Bishop, 2014).

Figura 12 – Ilustração da técnica de cultura por esgotamento em estria. Adaptado de <http://222.scimath.org/lesson-biology/item/7448-2017-08-11-07-30-49>



Legenda: A amostra deve ser distribuída no local representado pela letra A. Em seguida levar a ansa ao rubro e fazer deslizar a ansa três a quatro vezes a partir do primeiro local de inoculação (B). Repetir este processo (C) e na quarta passagem, após a repetição do processo anterior (D), seguir os movimentos sem tocar no local C em direção ao centro da placa (E) de modo a que seja possível ter colônias individuais.

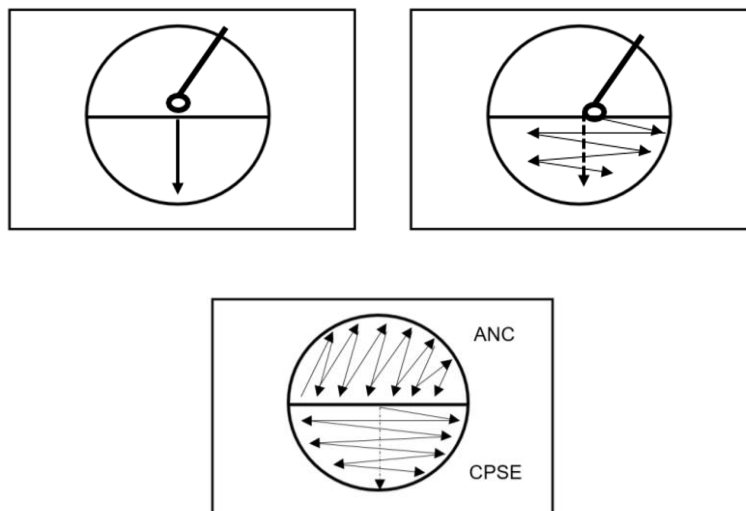
Após a incubação é essencial observar cuidadosamente o crescimento de colónias na placa, o seu aspeto, atividade hemolítica e se existe contaminação. As placas que apresentam crescimento misto devem ser replicadas de modo a obter culturas puras. Não devem ser descartadas placas que tenham menos de 72 horas de incubação (McCue & Bishop, 2014). As bactérias podem ser posteriormente congeladas quase indefinidamente em meio de glicerol e água de peptona tamponada para efeitos de estudos ou identificações posteriores (Koh, 2013).

7.1. Meio de cultura gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA)

Os novos meios cromogêneos foram desenvolvidos para facilitar e acelerar a identificação presuntiva da maioria dos isolados bacteriológicos de amostras urinárias. A identificação presuntiva é baseada nas diferentes cores e tamanhos das colônias. Esta cor é resultado de reações entre enzimas específicas das espécies e substratos cromogêneos incorporados no meio, são necessários apenas alguns testes de confirmação adicionais (Scarpato, Piccoli, Ricordi, & Scagnelli, 2002). O meio de cultura gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA), comercializado pela bioMérieux, é composto por dois meios dispensados numa placa de Petri, com compartimentos separados. Este meio está previsto para sementeira de amostras de urina. O meio CPSE, um agar translúcido, é um meio recente e tem como objetivo aumentar a sensibilidade de deteção de microrganismos e dar resultados em cerca de 16 a 18 horas (Rigaill et al., 2015). Este meio é excelente na deteção, determinação de contagem e identificação presuntiva de agentes patogénicos urinários, tanto em culturas puras como mistas (Scarpato et al., 2002).

O procedimento consiste em inocular a amostra, usando uma ansa de 10 μ como esquematizado na figura 13.

Figura 13 – Esquema de inoculação com ansa de 10 μ .

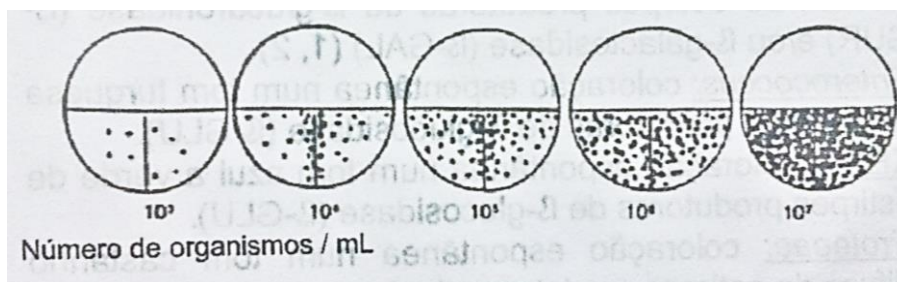


Legenda: Iniciar a inoculação no meio CPSE. Mergulhar a ansa de 1 μ no líquido e traçar o raio da placa com a mesma para dispensar o líquido contido. Sem adicionar mais líquido, fazer traços perpendiculares juntos por toda a placa. Fazer um grande número de estrias. Depois, sem adicionar mais amostra, inocular a gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro.

As placas devem ser incubadas invertidas a 35°C \pm 2°C em condições aeróbicas. As culturas são geralmente examinadas após 24 horas de incubação, mas podem ser observadas às 18h (chromID by bioMérieux, Ref: 418229).

Após a incubação e quando existe crescimento bacteriano, é possível fazer uma enumeração semiquantitativa, comparando a densidade de colónias presentes na placa de gelose chromid CPS Elite com o que é apresentado na Figura 14. A identificação presuntiva dos agentes presentes das colónias é feita seguindo as características descritas para o meio (Anexo III).

Figura 14 – Enumeração semiquantitativa. Adaptado da bula das placas de gelose chromid CPS Elite. Adaptado da bula chromID bioMérieux, Ref: 418229.



O método tem algumas limitações, como na identificação de *E.coli*, uma vez que há outras espécies podem produzir colónias da mesma cor como é o caso de *Citrobacter*. Outras espécies além de *Enterococcus* podem produzir colónias azuis turquesa, como é o caso de *Streptococcus agalactiae*. Scarparo, Piccoli, Ricordi, e Scagnelli, em 2002, consideraram ser fácil distinguir isolados de *Enterococcus spp.* e *Streptococcus agalactiae*.

Tabela 6 – Identificação presuntiva do microrganismo em meio CPSE. Adaptado de Scarparo et al., 2002.

Microrganismo	Características na placa
<i>Acinetobacter spp</i>	Colónias cremes
<i>Candida spp.</i>	Colónias convexas cremes/brancas
<i>Citrobacter spp</i>	Colónias azul a verde
<i>E.coli</i>	Colónias vermelhas a carmim ou beje
<i>Enterobacter spp</i>	Colónias azul-verde
<i>Enterococcus</i>	Colónias tom turquesa/azul. Pequenas.
<i>Proteeae</i>	Colónias creme ou com halo castanho
<i>Pseudomonas spp.</i>	Colónias transparentes, amarelas a verdes com bordo serrilhado, creme difuso com ou sem halo verde
<i>Salmonella spp.</i>	Colónias cremes
<i>Staphylococcus spp.</i>	Colónias brancas opacas a amarelo dourado ou rosa
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Colónias brancas
<i>Streptococcus spp.</i>	Colónias azuis claras (0,5 – 1mm)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Colónias brancas ou azul claro
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Colónias tom azul esverdeado

Em todos os casos em que seja necessária uma confirmação da identificação devem ser utilizados perfis de identificação: ID 32 E para *Enterobacteriaceae*, API 20 NE para bacilos gram-negativos, ID 32 Staph para *Staphylococcus*, API 20 Strep para *Streptococcus* e ID 32 C para leveduras (bioMérieux) (Scarparo et al., 2002).

Capítulo III – Trabalho experimental em culturas no meio gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA), citologias uterinas e métodos de recolha de amostras uterinas em éguas suspeitas de endometrites

1. Objetivo

Os objetivos deste trabalho foram testar a capacidade do meio gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA) em identificar os agentes de endometrites equinas. Descrever os achados microbiológicos, citológicos e as técnicas utilizadas para recolher a amostra. Validar os agentes identificados através de galerias de API® de isolados nas placas cromogéneas. Descrever a qualidade citológica e os métodos de recolha da amostra (zaragatoa, lavagem de alto volume e biópsia). Verificar se existe uma correlação entre os resultados das análises laboratoriais e o resultado reprodutivo.

2. Material e métodos

Este trabalho tem como base dados recolhidos na clínica Embriovet, prestação de serviços veterinários Lda., durante a época de reprodução de 2018. Uma parte laboratorial deste trabalho foi desenvolvida nas instalações e no laboratório da Embriovet, nomeadamente a recolha de amostras, processamento das mesmas para cultura e citologia, incubação das culturas, visualização de citologias e esfregaços das culturas corados com coloração Gram e congelação das bactérias para posterior confirmação da identificação através das galerias de API®. Esta última parte do trabalho foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, no laboratório de microbiologia.

2.1. Amostra

A amostra foi constituída por éguas (n=99) monitorizadas ao longo da época reprodutiva de 2018. A maioria das éguas são da raça Puro Sangue Lusitano ou cruzadas e apresentaram idades compreendidas entre os 3 e os 27 anos.

As éguas utilizadas neste estudo apresentavam sinais clínicos de endometrite, historial de absorção embrionária/infertilidade. Os sinais clínicos considerados foram o edema excessivo das pregas uterinas, encurtamento do ciclo éstrico, presença de líquido no lúmen uterino (Figura 15), corrimento vulvar, perda embrionária e diagnóstico de gestação negativo em éguas inseminadas com sémen de boa fertilidade.

Estas éguas foram sujeitas a IA com sémen refrigerado ou congelado, proveniente de garanhões de fertilidade conhecida.

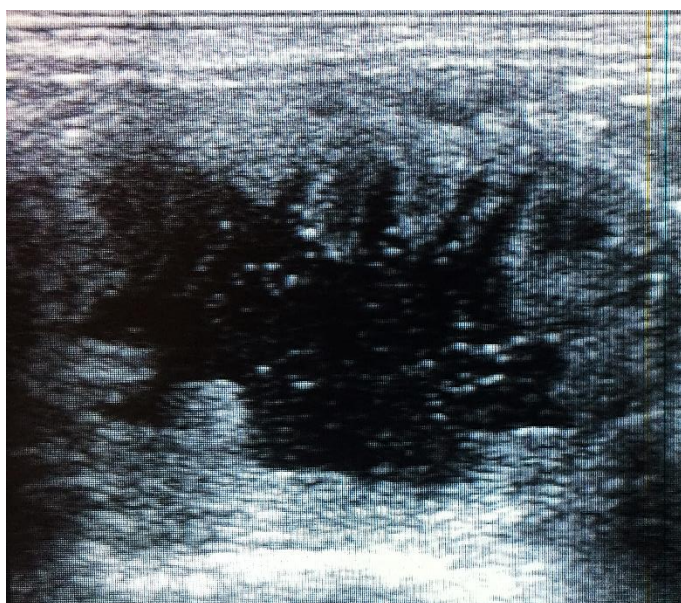
Para este estudo foram estabelecidas fichas individuais para cada égua, nas quais se registaram vários parâmetros (Anexo1).

Foram incluídos neste estudo todos os esfregaços avaliados citologicamente, com o objetivo de descrever a qualidade, os achados citológicos e a qualidade do método de recolha utilizado

para obter a amostra. Adicionalmente, em alguns casos, foram realizadas segundas e terceiras citologias com o intuito de avaliar a inflamação uterina e confirmar a presença de cristais de urina.

A recolha das amostras foi realizada maioritariamente no início do estro, de modo a que, quando fossem conhecidos os resultados das análises, ainda fosse possível instaurar uma terapêutica de acordo com os resultados da cultura e da citologia.

Figura 15 – Imagem de ecografia uterina transrectal apresentando líquido intra-uterino. Imagem capturada com camara de telemóvel (16 megapixéis).



2.2. Recolha e processamento de amostras

2.2.1. Biópsia

Os protocolos de recolha e processamento de amostras utilizados neste estudo foram uniformes e seguiram a metodologia adotada pela Embriovet. O procedimento de recolha de amostra por biópsia (Anexo V), foi antecedido por um exame ultrassonográfico para confirmar a fase do ciclo éstrico e recolher dados relevantes como a presença de fluido intrauterino e do grau de edema das pregas uterinas. De seguida, a cauda foi elevada e a zona perineal lavada com água e iodopovidona 7,5% solução sabonosa para uso cutâneo (Ref: 6924225, Alcoholes MONTPLET), sendo posteriormente seca com papel. O médico veterinário, após colocar a luva, segurava a pinça de biópsia estéril, com as mandíbulas fechadas passando delicadamente o cérvix. No momento em que a pinça atingia o lúmen uterino, o braço foi retirado da vagina e colocado no reto de modo a guiar a pinça para a base do corno uterino ou para o local suspeito de patologia. Quando a pinça estava no local desejado, as mandíbulas da pinça foram abertas e, através da via transretal, o médico veterinário exercia uma ligeira pressão ventral no reto de modo a colocar a amostra desejada entre as mandíbulas da pinça.

A pinça foi fechada e a amostra recolhida. Posteriormente a amostra foi delicadamente retirada da pinça, junto à lamparina, e colocada sobre uma lâmina estéril (Figura 16) durante 5 minutos para posterior fixação e observação citológica. Em seguida foi feita deslizar sobre uma placa de meio CPSE. Por último, a amostra, foi colocada em formol e enviada para laboratório.

Figura 16 – Imagem de biopsia depositada numa lâmina estéril para avaliação citológica.



2.2.2. Zaragatoa

Um exame uterino através de palpação transretal e exame ecográfico foram realizados previamente à recolha da amostra. A cauda foi suspensa e a zona do períneo lavada e seca como descrito anteriormente. Com uma luva estéril, o operador, colocava a zaragatoa McCullough (minitube, Ref. 17214/2951) na mão, protegendo a ponta com os dedos. Utilizando movimentos rotacionais, a mão foi passada para a vagina e foi palpado o cérvix exterior. O dedo indicador foi utilizado para conduzir a zaragatoa através do cérvix até ao útero, empurrando a primeira bainha de proteção. Quando a zaragatoa se encontrava no lúmen uterino, foi trespassada a segunda bainha, entrando em contacto com o endométrio. A zaragatoa foi rodada durante 30 segundos em diferentes direções. Após este tempo foi então recolhida de novo para dentro das bainhas de proteção e retirada do útero. A zaragatoa foi imediatamente acondicionada entre na bainha interior e fechada com as borrachas estéreis que acompanham o kit da zaragatoa (Figura 17). Foi avaliada a zaragatoa quanto às suas características macroscópicas como presença de sangue ou muco (Anexo IV).

Figura 17 – Exemplo de zaragatoa McCullough, zaragatoa acondicionada após a recolha e meio de transporte, de baixo para cima, respetivamente. Adaptado de www.minitube.com.



Figura 18 – Ilustração do método utilizado para realizar as lâminas citológicas a partir de zaragatoa.

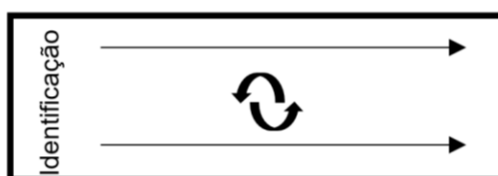
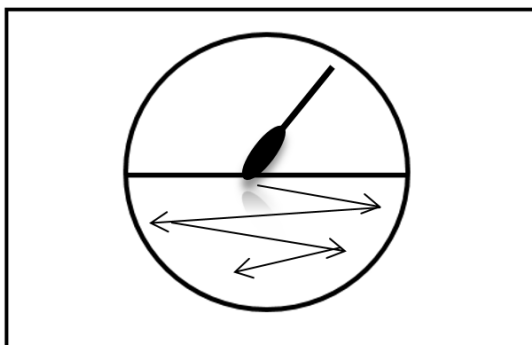


Figura 19 – Ilustração do método de sementeira com zaragatoa.



A amostra foi imediatamente processada, rolando sem grande pressão, sobre uma lâmina estéril em duas linhas paralelas e, por último, rodando a ponta da zaragatoa sobre um ponto no centro da lâmina como ilustrado na Figura 18. Em seguida foi realizada a sementeira na placa de cultura, iniciando a inoculação no meio CPSE. A zaragatoa deve ser colocada no centro, junto à divisão da placa e rolando a zaragatoa pela placa, trabalhando de um lado da placa para o outro, passando pelo centro. Devem ser feitas o maior número de estrias (figura 19).

2.2.3. Lavagem de alto volume

Foram realizadas lavagens uterinas, como meio de tratamento e de diagnóstico, a éguas que apresentaram fluido uterino à ecografia (pré ou pós-IA ou cobrição) e/ou edema endometrial excessivo pós-IA ou cobrição.

Figura 20 – Sonda de lavagem uterina desenvolvida na Embriovet.



Previamente à realização da lavagem de baixo de baixo volume (Anexo VI) foi executado um exame ultrassonográfico e palpação uterina transretal. Posteriormente a rabadia foi acondicionada e elevada, sendo a zona do períneo lavada e seca. O operador colocava a luva estéril e segurava a sonda de lavagem uterina também estéril (Figura 20). A sonda foi acoplada a um frasco de 1 litro de NaCl (Braun Vet, Ref:26/449282/0112), com movimentos rotacionais foi introduzida no cérvix até ao lúmen uterino, sendo então dispensado o litro de soro para o lúmen, aguardou-se uns segundos e no final foi recuperado por gravidade de novo para a garrafa de modo a não contaminar a solução recolhida, assegurando que esta constitui uma amostra exclusivamente uterina. O fluido foi avaliado imediatamente quanto às suas características macroscópicas como transparência, cor, viscosidade e presença de células ou sangue (figura 21). As garrafas de soro foram identificadas com o nome da égua, a data e a hora da lavagem. Todo o processamento foi realizado na câmara de fluxo laminar. Para o processamento da amostra a zona de encaixe do frasco de NaCl foi pulverizada com álcool a 70% e posteriormente foram retirados 35 mililitros de amostra, com uma agulha e seringa estéreis, para um tubo de Falcon estéril. A amostra foi diretamente inoculada na placa de cultura com uma ansa de 10 μ estéril descartável como descrito na figura 13. Posteriormente a amostra foi centrifugada a 400rpm, durante 10 minutos. Foi retirado o sobrenadante e com uma ansa descartável de 10 μ o pellet foi homogeneizado. Por último, os 10 μ retirados com a ansa foram distribuídos por uma lâmina de microscópio não estéril e fixada à chama. A cultura foi realizada antes da centrifugação de modo a não obter culturas com alta concentração de colónias para ser de mais fácil interpretação.

Figura 21 – Líquido recolhido de uma lavagem de alto volume, com turvação e cor amarelada. Pellet bastante notável de cor creme com a zona superior encarnada, sugerindo a presença de sangue.



2.2.4 Citologia

Foram realizadas 118 citologias, 53 a partir de zaragatoas, 60 através de lavagens de alto volume e 5 a partir de biópsia. Os métodos de processamento das amostras para cada tipo de técnica de recolha foram descritos anteriormente. As lâminas foram posteriormente coradas com coloração Diff-Quik (Diff-vet, dmv, Ref:907-1078). As lâminas foram observadas ao microscópio ótico (Olympus, modelo CH30, Ref:200). As lâminas coradas com a coloração Diff-Quik foram inicialmente observadas ao microscópio ótico numa ampliação de 10x de modo a ser avaliada a qualidade do esfregaço através da observação do conteúdo do fundo do mesmo e das células fragmentadas e distorcidas, bem como a quantidade de detritos presentes. Posteriormente, foi realizada a contagem do número de PMNs e das células endometriais a partir da avaliação de pelo menos 10 campos na ampliação de 40x, sendo registado número de PMNs por campo para posteriormente ser feita uma média. Foi ainda assinalada a presença de outras células como eritrócitos, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e a eventual presença de cristais urinários, muco, bactérias e fungos. A partir da análise do número de neutrófilos presentes, foi realizada a classificação citológica das amostras (Card, 2005; Cocchia et al., 2012; Riddle et al., 2007), como indicado nas tabelas 3 e 4 (Anexo II).

2.2.4.1 Coloração Diff-Quik

Os esfregaços obtidos foram secos ao ar ou à chama e posteriormente corados no laboratório do Centro de reprodução da Embriovet com uma coloração do tipo Romanowsky, o Diff-Quik (Diff-vet, dmv, Ref:907-1078). A coloração Diff-Quik consiste em três reagentes: o primeiro é

um fixador de solução de metanol, o segundo é um corante ácido, a eosina e o terceiro é um corante básico, o azul-de-metileno. Foi realizado o mesmo protocolo de coloração para todos os esfregaços. Em primeiro lugar a lâmina foi fixada na solução de metanol e de seguida foi corada. O procedimento consistiu em mergulhar a lâmina 5 vezes, durante 1 segundo, em cada uma destas soluções, tendo sido escorrido o excesso de solução entre elas. No final, a lâmina foi lavada com água corrente da torneira a baixa pressão e seca ao ar. Quando a lâmina se encontrava totalmente seca, foi observada ao microscópio.

2.3. Culturas no meio gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA)

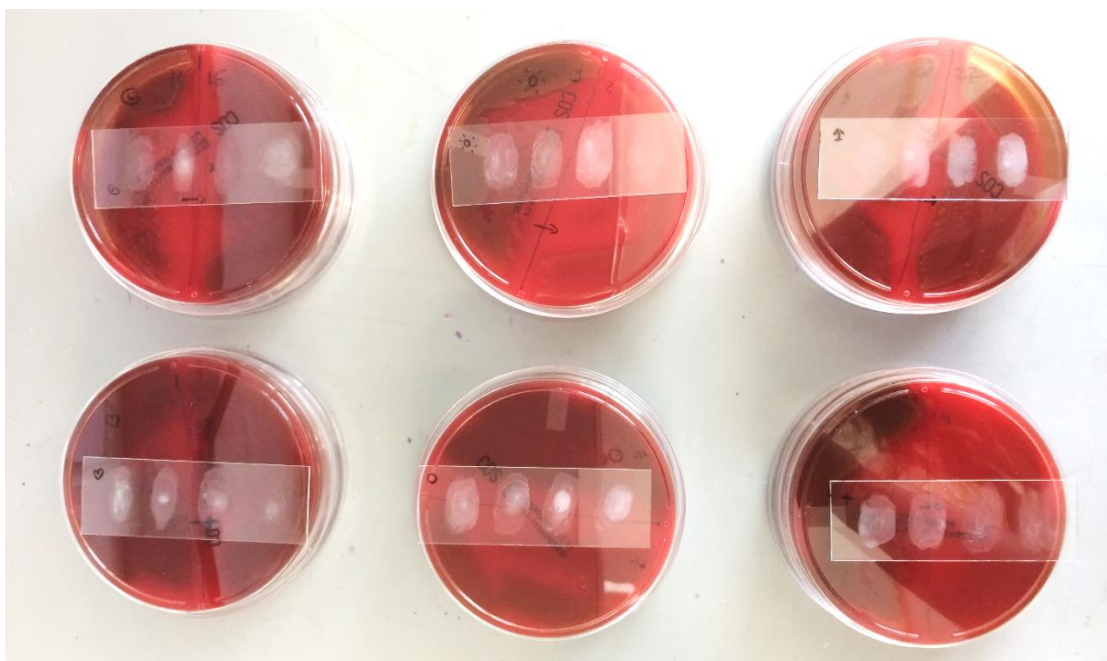
Para a realização das culturas foram utilizadas placas bipartidas com um meio cromogénico e agar sangue (gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA)) (Biomérieux, Ref 418229). Este meio está indicado para testes de urina humana, tendo sido, neste estudo, testada a sua aplicabilidade na identificação de agentes de endometrites em éguas.

Os métodos de sementeira utilizados foram descritos anteriormente. As placas foram incubadas a 36°C, durante 48 horas. Os resultados foram registados às 18, 24 e 48 horas. Foram consideradas válidas as culturas que apresentavam no máximo 2 tipologias de colónias e sem alterações anormais da cor do meio que fossem sugestivas de falhas na qualidade do mesmo. Foram também utilizadas placas unicamente cromogénicas (CHROMID® CPS® Elite, Biomérieux, Ref: 416172) que contêm o mesmo meio cromogénico que as placas de gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA). Estas placas foram utilizadas por razões económicas e para evitar desperdício de material, uma vez que estas placas já existiam no laboratório antes do início deste estudo. Para o isolamento de colónias de culturas consideradas válidas foram utilizadas placas de agar sangue (Columbia agar + 5% sheep blood, Biomérieux, Ref: 43049). As colónias foram isoladas com o objetivo de obter colónias puras para congelar e utiliza-las para a realização das galerias de identificação (Anexo III).

2.3.1. Coloração de Gram

Após uma cultura ter sido considerada válida, foram realizados esfregaços a partir de uma colónia e corados com coloração de Gram para confirmar a pureza da cultura, a forma e o Gram das bactérias (Figura 22). Os esfregaços foram feitos em lâminas não estéreis onde foram dispensadas pequenas gotas de soro estéril e com uma ansa estéril, tocou-se numa colónia e, em movimentos circulares, foi dispensada numa das gotas da lâmina. Depois de secos ao ar e fixados á lamparina, procedeu-se à coloração de Gram do esfregaço (Ref do kit da coloração Gram:1.118895.0001).

Figura 22 – Laminas dispostas sobre as placas, após fixação dos esfregaços para a coloração Gram. Imagem capturada com camara de 16mp.



Foi seguido o protocolo do kit de coloração: Corar o esfregaço com cristal violeta durante 60 segundos, deixar escorrer o corante e lavar com água corrente da torneira. Posteriormente cobrir a lâmina com o mordente (solução de lugol) durante 60 segundos; lavar com água e diferenciar com 3 a 5 gotas de álcool-acetona; lavar com água e contrastar com safranina durante 60 segundos; lavar com água e enxugar.

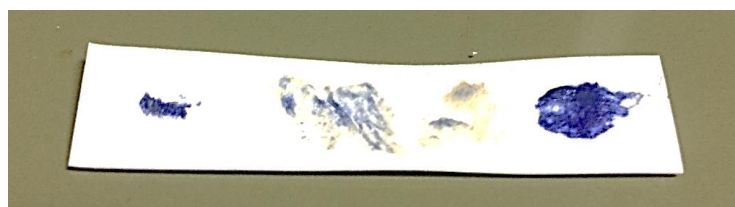
2.4.2. Testes de oxidase e catálase

Foram realizados testes de oxidase e de catálase (Tabela 7), para além da coloração Gram, a todas as colónias de culturas válidas para congelação e à maioria das culturas válidas em que não foram realizadas galerias de identificação. Estes testes têm como objetivo, não só ter indicação da galeria de identificação a utilizar, mas também como meio para obter mais informação sobre o agente isolado. Para o teste da oxidase foi utilizado o Pyo-Test® MW990 (mwe, medical wire, Ref: ISO 11014:2009; Figura 23) que é composto por tiras de papel absorvente impregnadas com p-fenilenodiamina, acondicionadas em frasco escuro e opaco contendo um agente dessecante. Estas tiras funcionam através da reação química de deteção da produção de indofenol. Para a realização deste teste foram utilizadas colónias recém-isoladas de bactérias.

O protocolo utilizado foi o seguinte:

1. Deixar que o frasco contendo as tiras adquira a temperatura ambiente antes de ser aberto;
2. Trabalhando próximo da chama abrir o frasco e com o auxílio de uma pinça em aço inoxidável retirar uma tira que deverá ser colocada sobre uma lâmina de microscópio limpa e seca; fechar imediatamente o frasco e retornar ao frio;
3. Utilizando um palito de madeira, previamente esterilizado, ou uma ansa de plástico estéril transferir assepticamente uma ou duas colônias da bactéria em análise e emulsionar sobre a superfície da tira;
4. Observar o resultado em até 10 segundos: o desenvolvimento de uma coloração violeta caracteriza a prova da oxidase positiva.

Figura 23 – Teste de oxidase positivo.

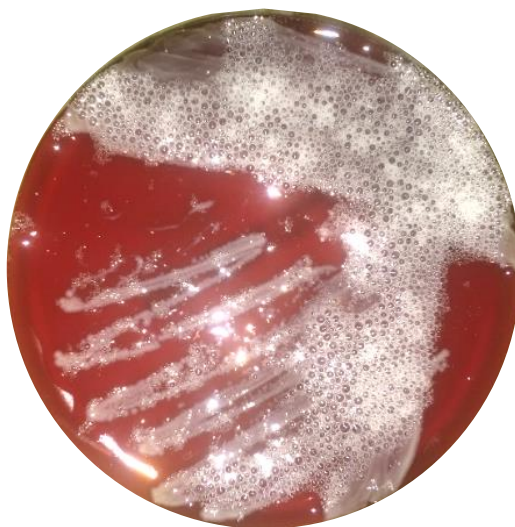


O teste da catálase é utilizado para diferenciar bactérias com a mesma coloração de Gram e resultados do teste da oxidase semelhantes. Foram dispensadas gotas de peróxido de hidrogénio em lâminas limpas, com uma ansa foi colhida uma amostra de uma colónia e dispensada na gota de peróxido de hidrogénio. O teste é positivo quando a catálase intracelular decompõe o peróxido de hidrogénio e há libertação de oxigénio e formação de bolhas macroscópicas (Figura 24).

Tabela 7 – tabela utilizada para classificação de microrganismos quanto á oxidase e catálase.

Microrganismo	Oxidase	Catalase
<i>Escherichia coli</i>	-	+
<i>Enterobacter spp</i>	-	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+
<i>Staphylococcus spp.</i>	-	+
<i>Streptococcus spp.</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+

Figura 24 – Reação observada quando dispensado peróxido de hidrogénio numa cultura catalase positiva.



2.3.3. Congelação de bactérias

Com o intuito de utilizar galerias de identificação para confirmar os resultados das placas, 24 isolados foram congelados em meio de água de peptona tamponada com 30% de glicerol (Biolife, Ref 4012782). O meio foi previamente preparado, distribuído por tubos de eppendorf de 1,5ml e levados ao autoclave a 121°C. durante 15 minutos. As bactérias isoladas no meio cromogénico foram replicadas em meio de agar sangue (biomerieux, Ref. 43041). Após 24h de incubação, com uma ansa de 10 μ estéril e descartável, uma colónia foi transferida para o meio e congelada a -20°C. Dois tubos de eppendorf foram, após alguns dias de congelação, deixados á temperatura ambiente até descongelarem e o conteúdo inoculado numa placa de agar sangue para testar se as bactérias se mantinham viáveis após o processo de congelação e se cresciam culturas puras ou havia sinais de contaminação.

2.4. Galerias de identificação bacteriológica

As galerias de identificação bacteriológica são galerias com diferentes testes específicos para cada grupo de microrganismos, permitindo-nos, de uma só vez, efetuar um conjunto de testes com as principais diferenças entre eles. Inclui testes como a fermentação de diferentes açúcares, a capacidade de digerir a gelatina ou hidrolisar a ureia. Para obter o resultado, é feita uma leitura das cores da galeria, de acordo com as instruções do fabricante. A identificação de bactérias através de galerias API® foi realizada no laboratório de microbiologia da Faculdade de medicina Veterinária de Lisboa. Este método foi utilizado para identificar 24 bactérias, congeladas, como descrito anteriormente, a partir de culturas válidas em meio gelose chromID® CPSE® Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro (CPSE/CNA). As características, como a cor, tamanho e β -hemólise das colónias nas placas cromogénicas utilizadas para a identificação foram registadas e fotografadas. Depois de descongeladas á

temperatura ambiente, as bactérias foram semeadas em placas de Columbia agar + 5% de sangue de ovelha (bioMérieux, Ref: 43049) e colocadas na estufa a 36°C durante 24h. Após as 24h, as culturas foram novamente replicadas em meio Columbia agar + 5% de sangue de carneiro de modo a garantir a pureza das culturas. Foi posteriormente confirmada a pureza das culturas através esfregaços das colónias corados com coloração de Gram. Após a confirmação da pureza e repetição dos testes de catálase e oxidase anteriormente descritos, procedeu-se á identificação bacteriológica a partir das galerias de API®. Foram utilizadas 3 galerias de API® 20NE (bioMérieux, Ref: 20 050) para identificação de pseudomonas, 10 galerias de API® 20Strep (bioMérieux, Ref: 20 600) para identificação de streptococcus e enterococcus e por último 11 galerias de API® 20E (bioMérieux, Ref: 20 100) para identificar Klebsiella e E.coli. Após a realização das galerias de API®, como descrito pelo fabricante, foram colocadas na estufa a 36°C durante 24h e no final deste tempo, foram colocados os necessários reagentes para a revelação dos resultados e, numa folha de resultados própria, anotou-se o resultado positivo ou negativo de cada teste, obtendo um código representativo de cada microrganismo. Este código foi inserido na plataforma on-line da bioMérieux e o resultado da identificação e respetiva percentagem de identificação são apresentados para cada código.

2.5. Análise estatística

Todos os dados recolhidos ao longo deste estudo foram registados e organizados em tabelas no programa Excel do Microsoft Office (versão 2016), para posterior análise estatística. Os dados foram analisados no programa R, versão 3.5.1. para o Windows, com a extensão *R commander* (Rcmdr). Este programa permitiu uma análise estatística inferencial e descritiva. Para verificar a existência de uma correlação estatística foram realizados vários testes e considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$. As amostras qualitativas categóricas foram analisadas através do teste exato de Fisher, em tabelas de contingência 2 x 2.

4. Resultados

O estudo com recurso à análise estatística permitiu analisar se existe correlação entre o microrganismo identificado como causa da endometrite, e a presença ou ausência de neutrófilos na análise citológica. Foi também analisada a correlação entre a bactéria identificada de forma presuntiva nas placas cromogéneas e a bactéria identificada através das galerias API®. Foram feitas descrições dos achados citológicos, das culturas e dos métodos de recolha de amostras e estudada a correlação entre o resultado reprodutivo e o tratamento presuntivo direcionado para o agente identificado nas placas cromogéneas.

3.1. Caracterização dos parâmetros avaliados

Foram realizadas 118 citologias, 53 a partir de zaragatoas, 60 através de lavagens de alto volume e 5 a partir de biópsia. Relativamente ao número de citologias positivas, 41% (48/118) das citologias realizadas a éguas suspeitas de endometrite foram positivas (48/118). Em relação às culturas, 61% foram positivas (62/101), sendo que no total 11% revelaram contaminação (11/101).

3.2. Citologias

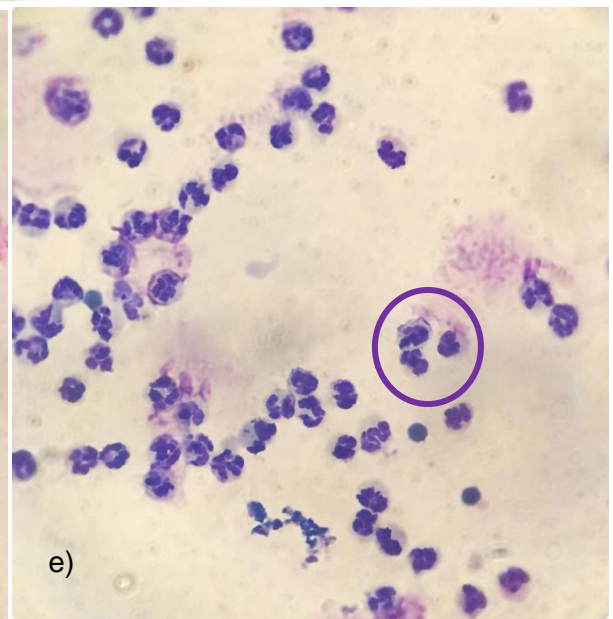
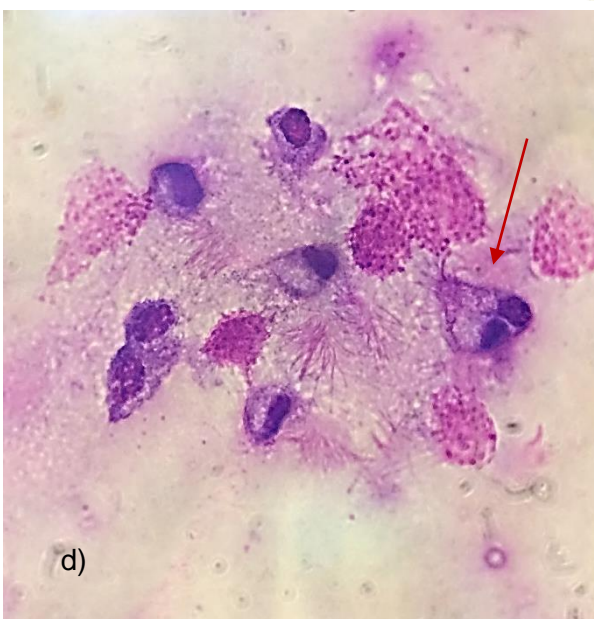
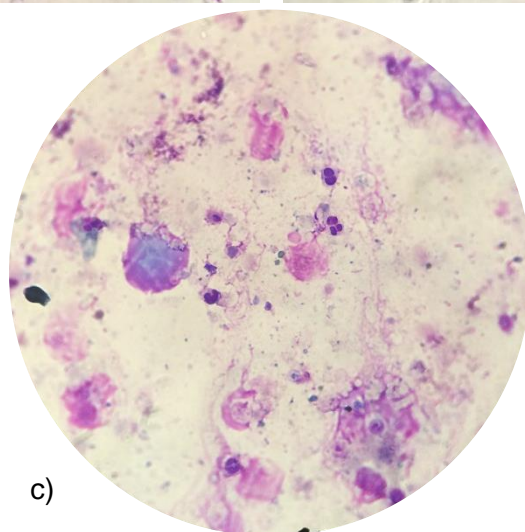
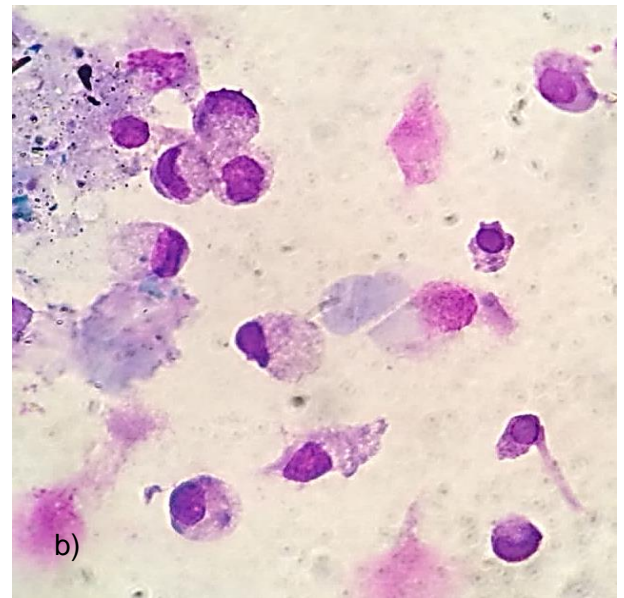
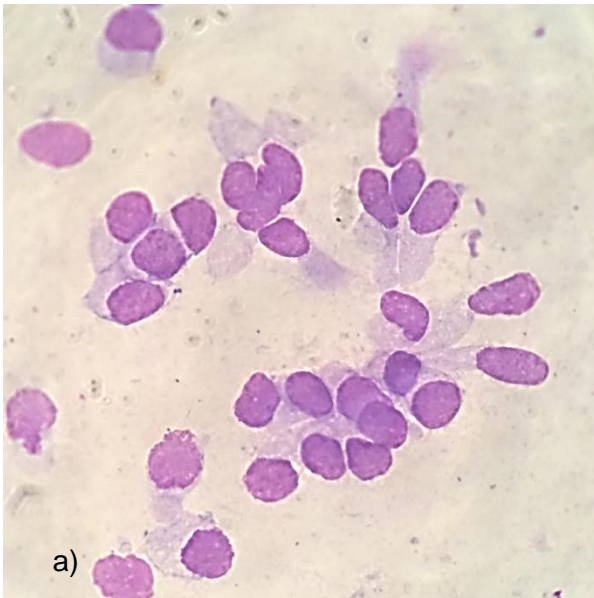
As citologias foram classificadas como positivas quando se verificou a presença de pelo menos um neutrófilo em 10 campos, assim sendo, 41% (48/118) das citologias realizadas a éguas suspeitas de endometrite foram positivas. Para além dos neutrófilos foram ainda observados outros leucócitos, sendo que os mais comuns foram os eosinófilos (6/118), que em 100% dos casos, foram também identificados cristais de urina ou leveduras/fungos na mesma citologia (Figura 25f). Em 13% das citologias foram observados cristais (16/118), sendo que em 5 destas 16 éguas foram consistentes os resultados numa segunda citologia de controlo (Figura 25h).

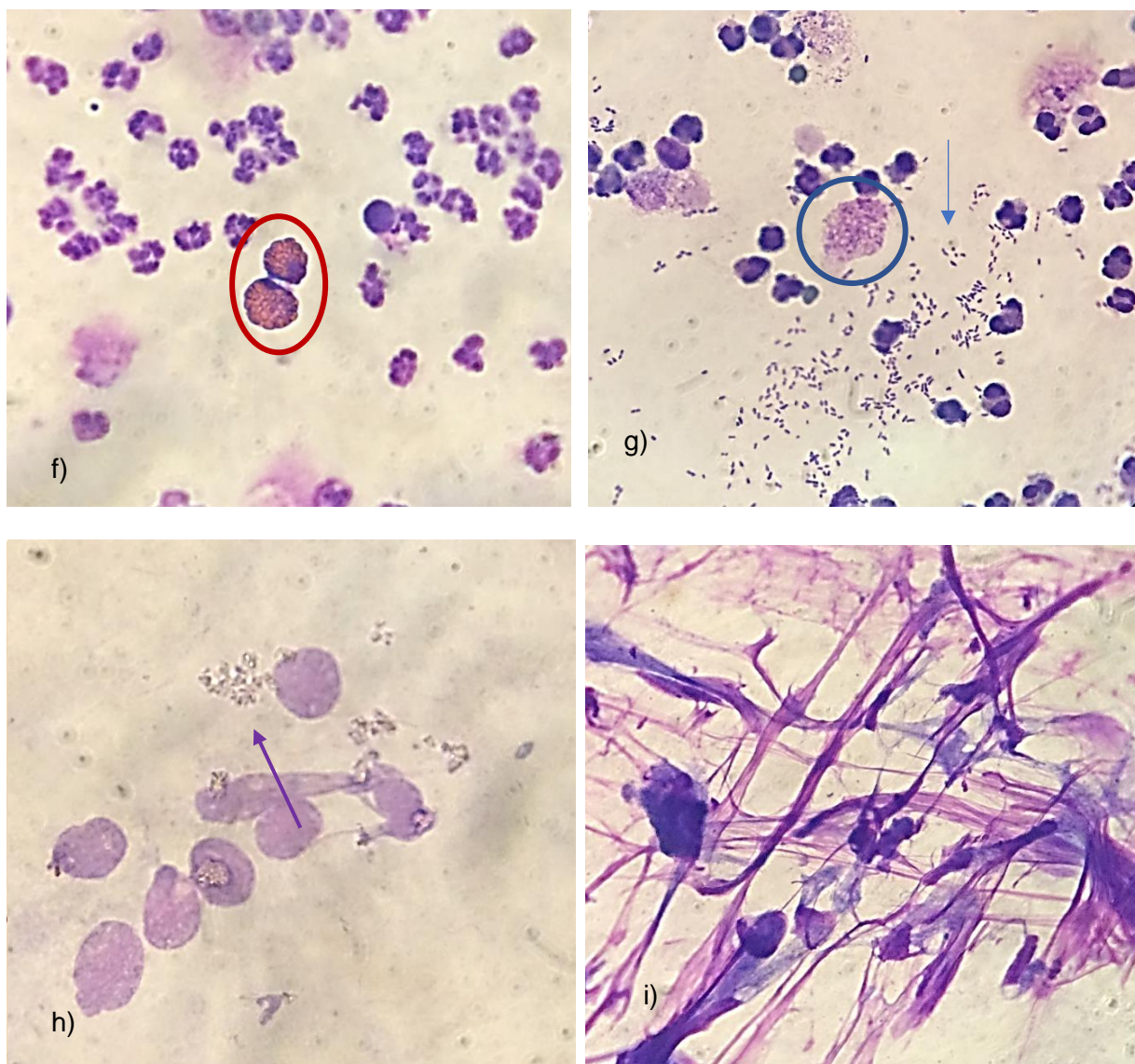
Foram visualizadas bactérias em 4 citologias (4/118), 3 das quais foram acompanhadas de cultura microbiológica positiva (Figura 25g). A amostra em que apenas a citologia obteve um resultado positivo, foi acompanhada da presença de neutrófilos (>10 PMN/hpf). Em 13% (16/118) das citologias foi observada uma grande quantidade de muco (Figura 25i). A tipologia de células uterinas observada foi concordante com o que está descrito na literatura, cuboides no diestro e colunares durante o estro (Figura 25 a e b) (Couto & Hughes, 1984). Não foram realizadas citologias de éguas em anestro. As células ciliadas foram encontradas apenas em 4% das citologias (5/118) (Figura 25d). Os detritos foram classificados na maioria das citologias, excluindo as que apresentavam má qualidade e tiveram de ser repetidas (Figura 25c). Em relação aos detritos, estes foram registados em 54 citologias, tendo os resultados sido: 29 <25%, 15 entre 25 e 50% e 10 >50% (Tabela 8).

Tabela 8 – Frequência dos detritos encontrados

Classificação	Frequência
<25%	54% (29/54)
25 – 50%	27% (15/54)
>50%	19% (10/54)

Figura 25 – Imagem de citologias coradas com Diff-Quik®.

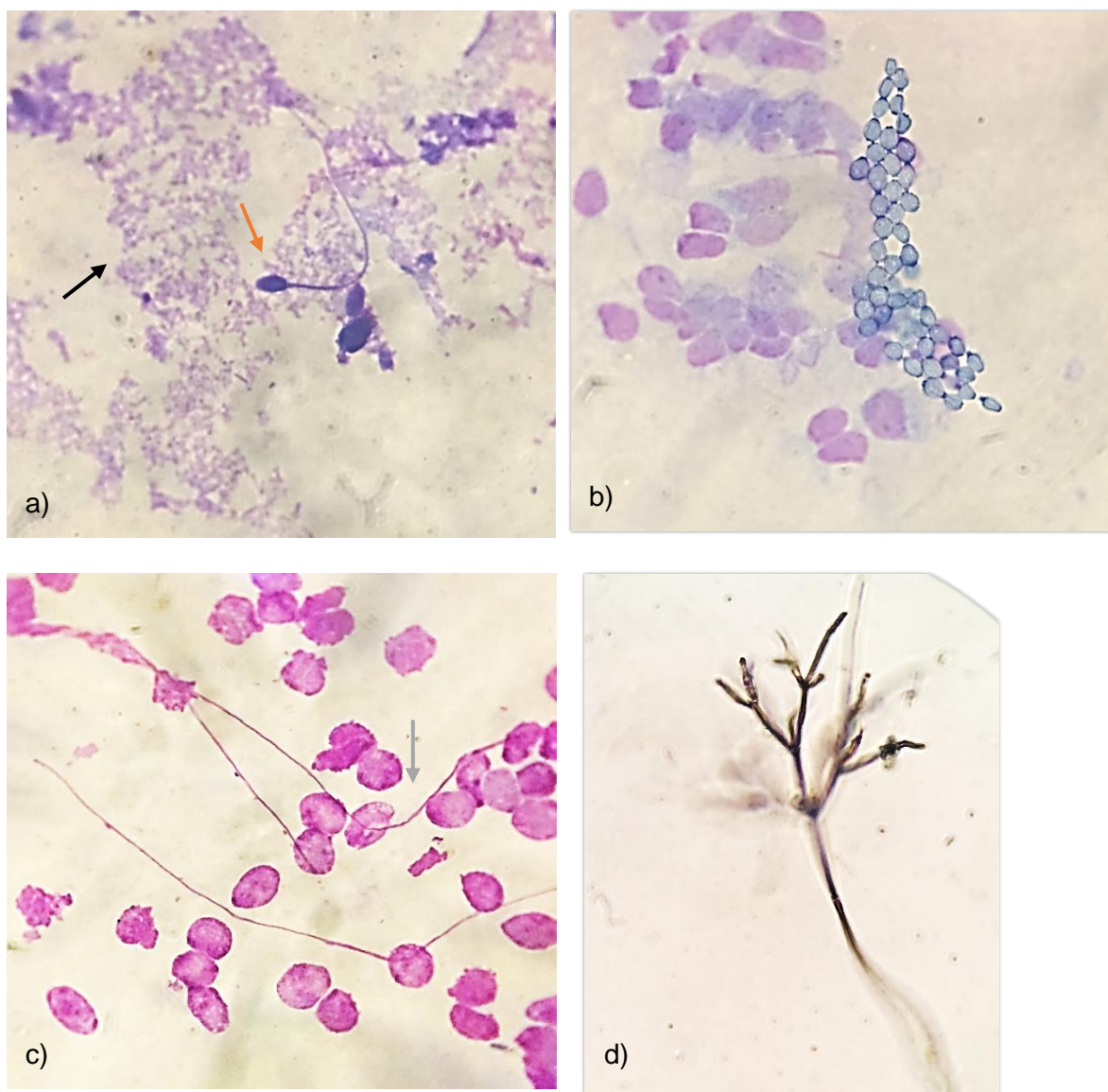




Legenda: a) células uterinas colunares; b) células uterinas cuboides; c) campo microscópico de citologia com >50% de detritos d) células ciliadas (seta vermelha); e) Neutrófilos (círculo roxo); f) Eosinófilos (círculo vermelho); g) Bactérias (seta azul) e célula uterina roturadas pela centrifugação da amostra de alto volume (círculo azul); h) Cristal de urina (seta roxa); i) Grande quantidade de muco numa citologia recolhida por lavagem de alto volume.

Foram ainda encontrados espermatozoides em 3% das citologias (3/118) (Figura 26a). Em 6% (7/118) das citologias foram identificadas formas de leveduras ou fungos. As formas encontradas foram coincidentes com hifas, pseudo-hifas e leveduras (Figura 26a, b e c).

Figura 26 – Citologias uterinas coradas com Diff-Quik®



Legenda: a) espermatozoide (seta laranja) e detritos (seta preta); b) leveduras; c) hifas (seta cinzenta) d) hifa

3.2.1. Método de recolha da amostra e resultados citológicos

As citologias feitas a partir de amostras recolhidas por zaragatoas apresentaram consideravelmente menos qualidade do que as obtidas pelos restantes métodos. A falta de qualidade é referente principalmente à menor quantidade de células uterinas (hipocelularidade) e células destruídas pelo processo de arrastamento. As citologias de amostras colhidas por lavagem de alto volume, por vezes, apresentavam uma grande quantidade de células uterinas roturadas, o que é impeditivo de avaliar o grau de lesão celular. Apesar deste ponto negativo, estas citologias mantinham a integridade celular dos neutrófilos, sendo possível, sem qualquer limitação, classificar as amostras como positivas ou negativas e qual o grau de severidade. Das citologias feitas a partir de amostras recolhidas por

zaragatoa, 21% (11/53) foram positivas. Em relação às citologias feitas a partir de lavagens de alto volume, 50% foram positivas (30/60).

3.3 Culturas Microbiológicas

Foram realizadas no total 101 culturas a partir de diferentes métodos de recolha de amostra. Em 61% (62/101) destas culturas foram obtidos resultados classificados como positivos. Foram contabilizadas 11 culturas que tiveram como resultado contaminação.

Tabela 9 – Frequência de cada bactéria nas culturas

Bactéria	Frequência na cultura
<i>Escherichia coli</i>	17
<i>Enterococcus faecalis</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
<i>Staphylococcus spp.</i>	5
<i>Streptococcus spp.</i>	23
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5

É possível, através da Tabela 9, concluir que as bactérias mais frequentes neste estudo foram o *Streptococcus* e *E.coli*. A bactéria menos frequente foi *Enterococcus faecalis*.

3.3.1 Resultados da cultura, citologia e método de recolha da amostra

Neste estudo verificou-se que 61% das culturas foram positivas (62/101). Das culturas feitas com amostras a partir de zaragatoa, 57% (31/54) foram positivas, enquanto 67% (29/43) das culturas feitas a partir de amostras recolhidas por lavagem de alto volume foram positivas. Em 54 análises em que foram feitas cultura e citologia a partir de zaragatoa, apenas 17% (9/54) tiveram citologia e cultura positivas. Dos testes feitos com lavagens de alto volume, 33% (14/43) tiveram ambos os testes positivos. As culturas realizadas a partir de zaragatoas, tiveram o resultado igual em ambos os exames em 46% (25/54), ou seja, ou ambos negativos ou ambos positivos. Esta mesma análise feita para a lavagem de alto volume permitiu constatar que 44% (19/43) dos testes tiveram o resultado semelhante.

Foi ainda possível constatar que em 16% (7/43) das análises realizadas a partir de lavagem de alto volume a citologia foi positiva e a cultura negativa. Esta situação não se verificou em casos em que se utilizaram zaragatoas ou biópsias. Em 30% (16/54) dos testes feitos a partir de zaragatoa, tanto a cultura como a citologia foram negativas. Quando se constata os resultados negativos nos dois testes para a lavagem de alto volume, esta percentagem desce para os 12% (5/43). Como apenas foram feitas culturas de 4 biópsias foi considerado pouco representativo, sendo que 2 tiveram cultura positiva e as outras 2 tiveram a cultura contaminada. Em relação às culturas que tiveram como resultado contaminação (11/101), 2

foram feitas a partir de biopsias, 7 por zaragatoa e 2 por lavagem de alto volume. Não se verificou correlação estatística entre os achados citológicos e a bactéria identificada.

Tabela 10 – Resultado das culturas, citologias e métodos de recolha da amostra.

Citologia	Cultura	Zaragatoa	LAB	Biópsia	Total
+	+	9	14	1	24
-	-	16	5	0	21
+	-	0	7	0	7
-	+	22	15	1	38
Contaminação		7	2	2	11
Total		54	43	4	101

3.3.2 Resultados da cultura e teste de identificação

Foram congeladas para identificação por galeria de API® 26 bactérias. Destas 26 bactérias, 9 foram suspeitas de *Streptococcus*, 6 de *E.coli*, 4 de *Pseudomonas*, 1 *Enterococcus*, 1 de *Proteus* e 3 de *Klebsiella*.

Uma das bactérias suspeita de *E.coli* não cresceu depois de descongelada tanto no meio de agar sangue, como em meio líquido. Outra bactéria, depois de replicada e realizado o teste de Gram para confirmar a pureza, foi descartada por suspeita de contaminação. Foram então realizadas 24 galerias de API®.

Os resultados obtidos nas galerias de identificação foram comparados com a identificação presuntiva feita a partir da observação direta nas placas cromogéneas e testes de oxidase, catalase e coloração de Gram.

Tabela 11– Resultado estatístico dos agentes identificados de forma presuntiva nas culturas e pelas galerias de identificação.

Bactéria	<i>Streptococcus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Proteus</i>
API®	9	7	3	1	4	0
Cultura	9	6	4	1	3	1
P Value	0,0000007648	0,00005201	0,001976	0,03846	0,001976	0

Através da análise estatística é possível dizer que existe uma correlação positiva estatisticamente significativa entre os resultados das galerias de identificação e das culturas cromogéneas. Esta correlação permite, com cautela, fazer uma extrapolação para os resultados encontrados nas restantes placas em que não foi feita a identificação por galerias de API®. Não devem ser dispensados os testes da oxidase, catalase e coloração de Gram,

uma vez que estes são testes rápidos e dão mais fiabilidade ao diagnóstico presuntivo. Um caso suspeito de *Proteus*, acabou por revelar ser *E.coli*, e um caso suspeito de *Pseudomonas*, identificou-se como *Klebsiella* nas galerias de identificação.

Figura 27 – Galerias de API®



Legenda: a) API® 20Strep *Streptococcus equi* spp. zooepidemicus; b) API® *Streptococcus dysgalactie* ssp. *Equisimilis* c) API® 20Strep *Enterococcus faecalis*; d) API® 20E *Klebsiella pneumoniae*; e) API® 20E *E.coli*; f) API® 20NE *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.3. Características das colónias no meio cromogénico

Foram sempre registadas as características das colónias no meio cromogénico, assim como, o resultado da coloração Gram. O teste da oxidase nem sempre foi executado, mas quando foi, o seu resultado foi também registado. Com base nas características da colónia e com os dados já descritos para este meio, foram registados os resultados presuntivos das culturas. Estes resultados estão resumidos na tabela 12 e Figura 29.

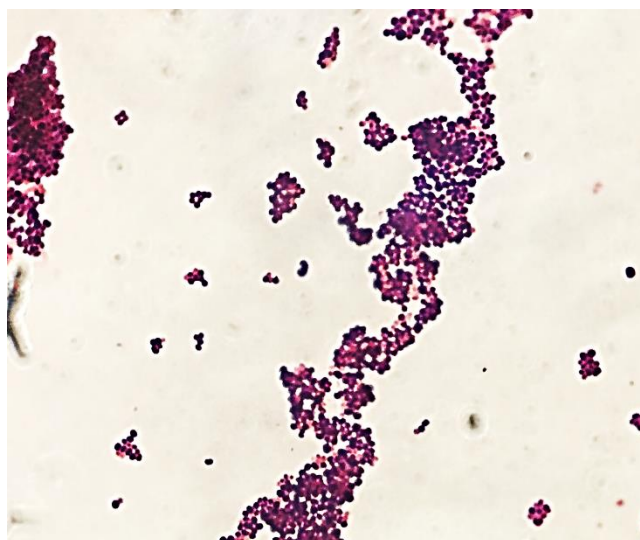
Tabela 12 – Características dos microrganismos identificados.

Microrganismo	Características na placa	Tamanho colónias	Gram	Cat	Oxi	ID %
<i>E.coli</i>	Colónias vermelhas a carmim ou cremes	3-4 mm	Bacilos Gram -	+	-	99%
<i>Enterococcus faecalis</i>	Colónias tom azul turquesa.	2 mm	Cocos Gram +	-	-	72.3%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colónias com bordo serrilhado, creme difuso a castanho	3-5mm	Bacilos Gram -	+	+	99.5%
<i>Staphylococcus spp.</i>	Colónias brancas opacas a amarelo dourado ou rosa		Cocos Gram +	+	-	-
<i>Streptococcus equi spp. zooepidemicus</i>	Colónias azuis claro ou azul metálico. Halo β -hemolítico exuberante no agar.	1,5-2mm	Cocos gram +	-	-	99.9%
<i>Streptococcus dysgalactie spp. equisimilis</i>	Colónias brancas ou azul turquesa. Colónias no agar mais baças e com menos halo β -hemolítico.	1,5-2mm	Cocos gram +	-	-	68.2 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Colónias tom azul esverdeado	2-3mm	Bacilos gram -	+	+	99.1%

As colónias suspeitas de *Staphylococcus spp.* não foram confirmadas por galeria de identificação, uma vez que, quando se iniciou o processo de congelação das bactérias não surgiu nenhum caso com esta bactéria, não tendo sido possível congelar e identificar. A identificação foi totalmente presuntiva e baseada em dados de estudos anteriores sobre as características das colónias no meio utilizado e no teste da catalase e coloração de Gram.

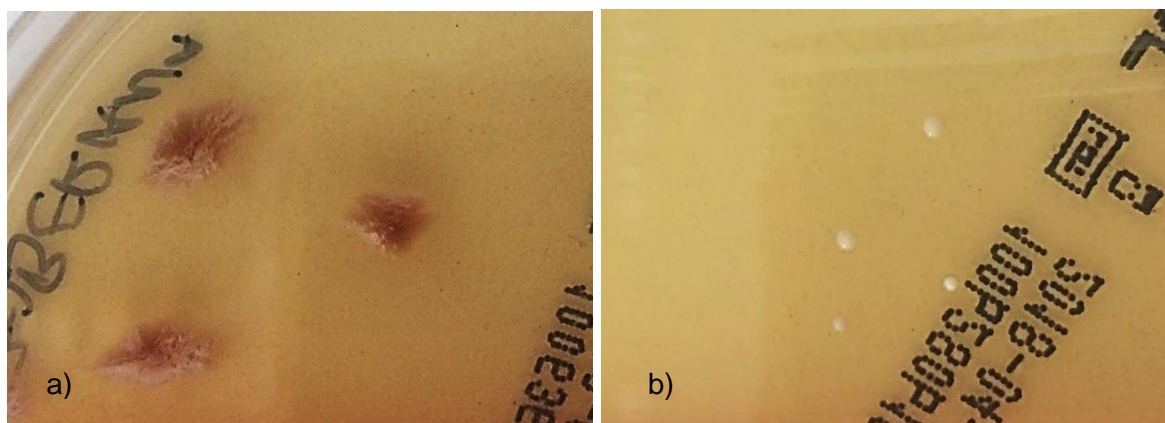
O *Staphylococcus spp.* é a única bactéria descrita, que neste meio, apresenta colónias brancas opacas, cocos Gram + e catalase positiva. As colónias de *Staphylococcus spp.* poderiam ser confundidas com as de *Streptococcus dysgalactie spp. equisimilis* se não fosse realizado o teste da catálase e a coloração de Gram (cocos Gram positivos em cacho de uva) (Figura 28).

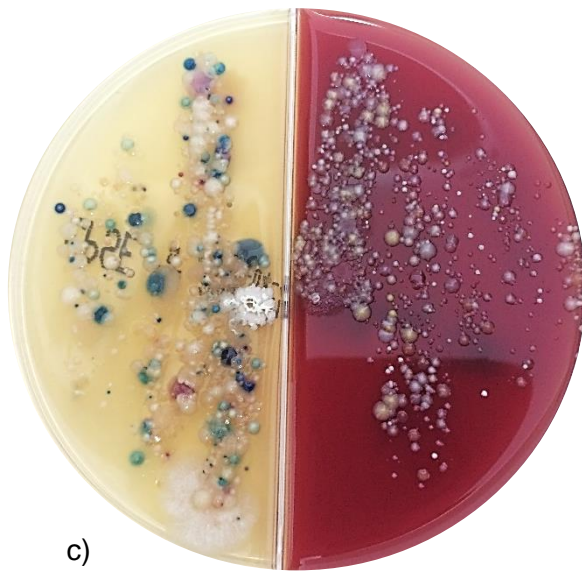
Figura 28 – Esfregaço de uma colônia suspeita de ser *Staphylococcus spp* corado com coloração Gram (1000x).



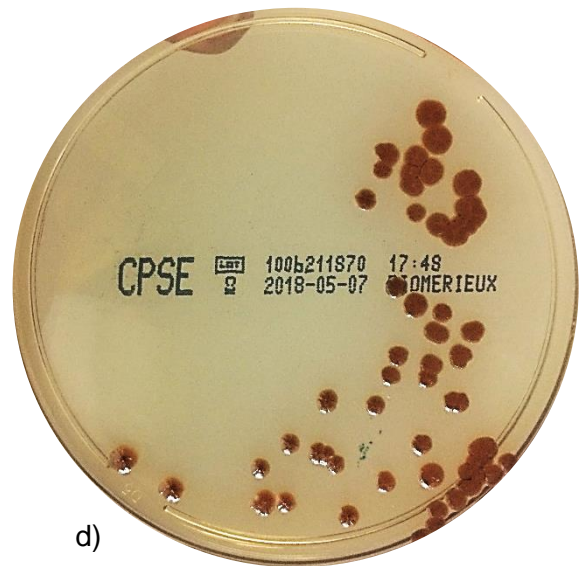
A distinção entre colônias de *Enterococcus* e *Streptococcus dysgalactie spp. equisimilis* não é inicialmente simples, esta distinção foi facilitada quando a acompanhar as colônias azuis pequenas no meio cromogêneo surgiam, no meio de agar, colônias em que se verificava β -hemólise, sendo assim indicativo de *Streptococcus*. Por sua vez, as colônias de *E.coli*, *Pseudomonas* e *Klebsiella* são relativamente fáceis de identificar por serem características, apresentando poucas variações. Num dos casos, cresceram colônias cremes, oxidase duvidosa, catálase positiva e bacilos Gram -, foi uma cultura em que se suspeitou estar na presença de *Proteus*, foram congeladas e através das galerias de identificação, e como já descrito na literatura, verificou tratar-se de um caso de *E.coli* sem atividade de β -glucuronidase (β -GLU) ou β -galactosidase (β -GAL) (Anexo III), não produzindo a cor carmim. As colônias de *Pseudomonas* apresentaram um cheiro característico que definiria como “cheiro a dentista” e no agar sangue têm uma coloração esverdeada.

Figura 29 – Fotografias de placas cromogêneas.

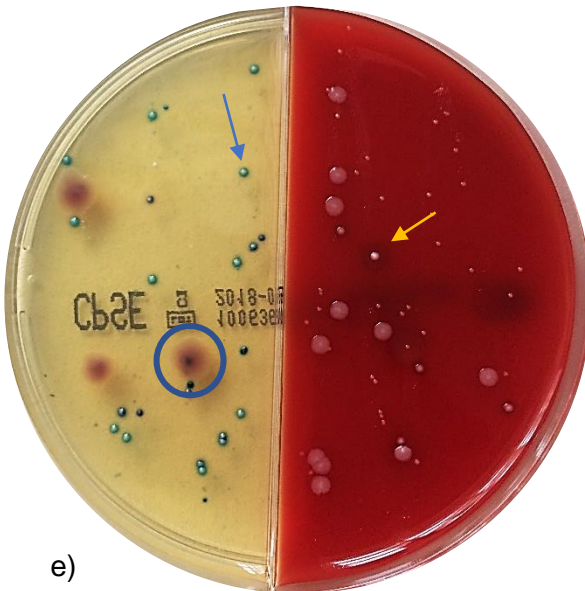




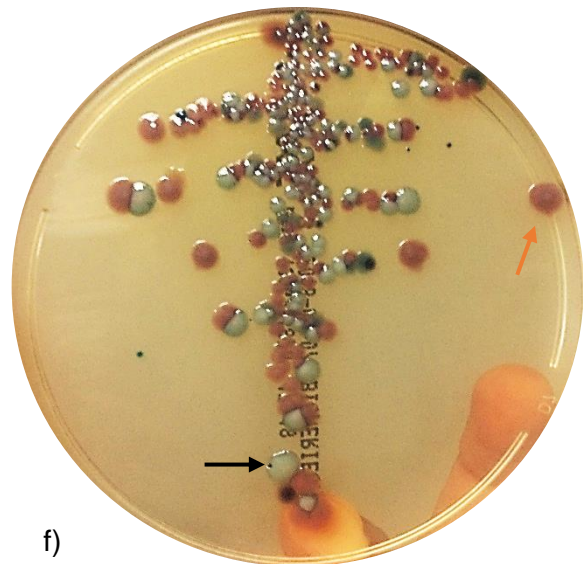
c)



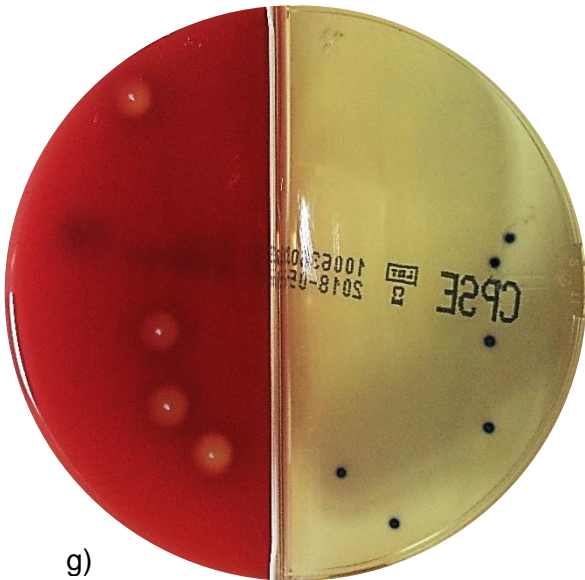
d)



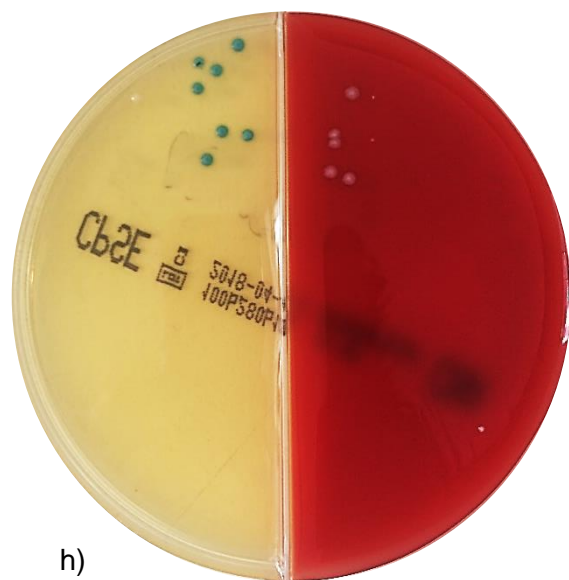
e)



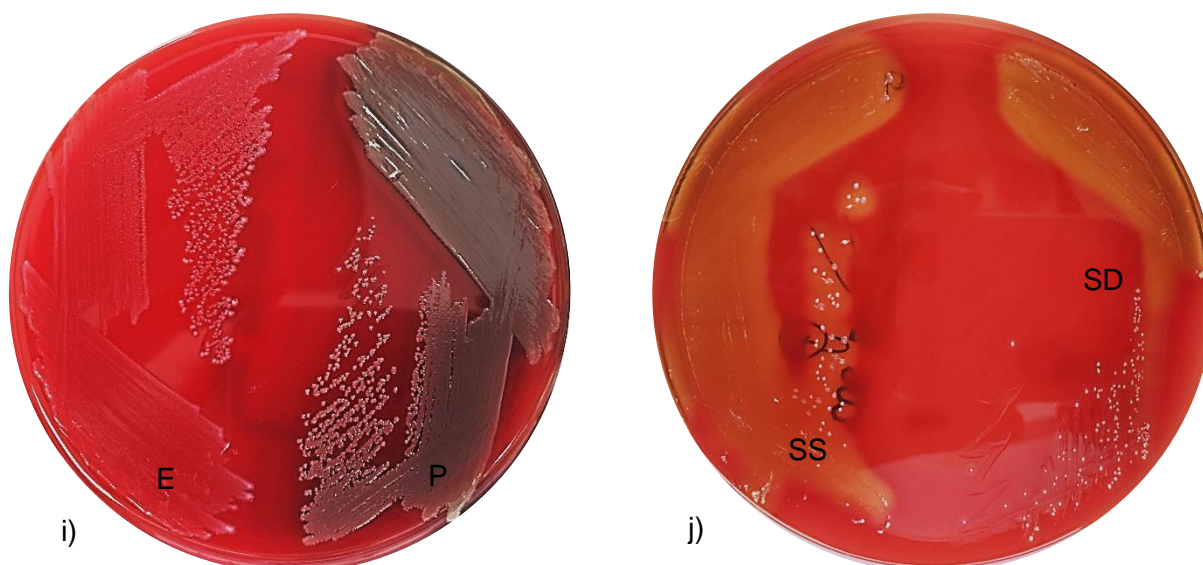
f)



g)



h)



Legenda: a) Colônias pseudomonas, castanhas com os bordos arredondados; b) Colônias suspeitas de serem de *Staphylococcus spp.* c) Placa contaminada d) Colônias de *Pseudomonas* e) Circulo azul contém no seu interior uma colônia de *E.coli*, seta azul aponta uma colônia de *Streptococcus*. É ainda de notar o halo β -hemolítico das colônias de *Streptococcus* no agar sangue (seta amarela) e a diferença de tamanho das colônias; f) Cultura mista em placa cromogênea contendo colônias de *E.coli* (seta laranja) e de *Klebsiella* (seta preta); g) Cultura de *Streptococcus*.; h) Cultura de *Enterococcus*. É de notar que as colônias no agar sangue não apresentam β -hemólise; i) Replicação de *E.coli* (E) e *Pseudomonas* (P). As *Pseudomonas* apresentam uma cor esverdeada no agar sangue; j) Isolamento de *Streptococcus spp* (SS). e *Streptococcus dysgalactiae spp. equisimilis* (SD), o halo β -hemolítico é menor nas colônias de *Streptococcus dysgalactiae spp. equisimilis*, na imagem não é perceptível que as colônias desta bactéria são mais baças.

4. Resultado reprodutivo e resultado dos testes laboratoriais

Sempre que o resultado da cultura e da citologia foi concordante (ambos positivos ou ambos negativos), considerou-se a análise laboratorial válida. Quando a cultura foi positiva o tratamento, apesar de presuntivo uma vez que não foram realizados TSA, foi dirigido no sentido de combater o agente isolado. Na Tabela 13 estão correlacionados os resultados das culturas e das citologias com dos resultados reprodutivos no ciclo em que foi realizada a análise. Nos casos em que o resultado foi considerado válido na cultura, através de um resultado concordante na citologia, a égua foi tratada de modo a eliminar a bactéria identificada. Apenas foram consideradas nesta tabela as éguas em que é conhecido o resultado reprodutivo.

Tabela 13 – Resultados das culturas e resultados reprodutivos

<div>Resultado Reprodutivo</div> <div>Cultura + citologia</div>	Negativa	Positivo
Negativas	9/21 (43%)	12/21 (57%)
Positivas	12/24 (50%)	12/24 (50%)
	21/45 (47%)	24/45 (53%)

$p\text{-value} = 0.00004248$

Verificou-se uma correlação estatisticamente significativa ($p\text{-value} = 0.00004248$) entre os resultados reprodutivos e os testes laboratoriais considerados válidos (cultura e citologia ambos positivos ou negativos). Tiveram um resultado reprodutivo positivo 53 % (24/45) das éguas que tiveram os resultados laboratoriais (cultura microbiológica e citologia) semelhantes (ambos positivos ou ambos negativos). Em 47% (21/45) dos casos acima descritos, o resultado reprodutivo foi negativo. Nos casos em que ambos os resultados foram negativos e não receberam tratamento, 43% das éguas tiveram um resultado reprodutivo negativo e 57% tiveram um resultado positivo. Quando ambos os testes foram positivos e as éguas receberam tratamento direcionado para a bactéria isolada em 50% o resultado reprodutivo foi positivo e em 50% foi negativo.

5. Discussão

Este estudo teve como objetivo experimental testar a aplicabilidade prática de um meio cromogénico, utilizado para amostras urinárias humanas, em amostras uterinas de éguas suspeitas de endometrite. Durante a observação das atividades diárias no centro de reprodução, foi notória a importância da rápida identificação dos agentes das endometrites. A relevância da rapidez de diagnóstico dos agentes etiológicos prende-se com o impacto económico das endometrites ao não serem perdidos ciclos éstricos e os tratamentos serem corretamente dirigidos. O meio cromogénico testado neste estudo apresenta resultados presuntivos em 18/24h. Este meio tem limitações que podem ser colmatadas se, à cultura microbiológica, forem conjugados os testes de oxidase, catalase, coloração de Gram e citologia. Foram realizadas 101 culturas microbiológicas, das quais 62 foram positivas (61%). Riddle, LeBlanc e Stromberg (2007), encontraram culturas positivas em 11% das éguas utilizadas no estudo. Este resultado pode ser explicado por, no estudo referido, a amostra ser aleatória, enquanto neste estudo foram utilizados animais com sinais de endometrite ou infertilidade. Estes resultados devem sempre ser cautelosamente avaliados com os sinais clínicos, história reprodutiva da égua e com os resultados da citologia. Foi notória uma

correlação entre os resultados das galerias de identificação e os resultados das culturas, mas não se verificou correlação entre os achados citológicos e o agente identificado na cultura. Foram fotografados e registados os achados citológicos e os dados destes foram cruzados com os resultados das culturas e com o método de recolha da amostra, verificando-se que em 45% (45/101) os resultados foram concordantes entre a citologia e a cultura. Riddle, LeBlanc e Stromberg (2007), verificaram uma percentagem de 64% de resultados concordantes entre citologias e cultura microbiológicas. Neste estudo foram utilizadas éguas com sinais clínicos de endometrite ou infertilidade. Algumas destas éguas, provavelmente, são afetadas por endometrites subclínicas latentes ou focais sem sinais de inflamação na citologia ou com culturas negativas. Este facto justifica o menor número de resultados concordantes entre os dois testes neste estudo.

5.1 Citologias

Das 118 citologias realizadas, 53 a partir de zaragatoas, 60 através de lavagens de alto volume e 5 a partir de biopsia. Em 41% (48/118) das citologias realizadas a éguas suspeitas de endometrite os resultados foram positivos. Riddle, LeBlanc e Stromberg (2007), utilizando a mesma escala de classificação da inflamação que foi utilizada neste estudo, obtiveram 20% de citologias positivas. Esta diferença pode ser justificada pelo facto de neste estudo, todas as éguas utilizadas, terem sinais clínicos de endometrite ou infertilidade, ao contrário das que foram utilizadas no estudo acima referido. Foram encontrados eosinófilos em 5% (6/118) das citologias e foram sempre associados a casos, em que na citologia, se verificou a presença de cristais ou leveduras/fungos. Esta associação está de acordo com o previamente descrito por Ferris et al. (2015). Em 13% (16/118) das citologias foram observados cristais e quando realizadas segundas citologias de controlo, com métodos de recolha diferentes, esta presença de cristais foi consistente, o que atribui valor de diagnóstico para urovagina às citologias (Roszel & Freeman, 1988; Ferris et al., 2015). Uma citologia em que foram observadas bactérias, não foi acompanhada de cultura positiva, mas foi acompanhada da presença de neutrófilos ($>10\text{PMN/hpf}$). Esta situação pode ser justificada por uma contaminação da lâmina utilizada na citologia, falha na qualidade do meio ou falha durante a incubação (LeBlanc, 2007). No entanto, a presença de neutrófilos nesta citologia sugere que está a decorrer um processo inflamatório. Em 13% (16/118) das citologias foi observada uma grande quantidade de muco. Tendo em conta que a maioria das amostras foram recolhidas no início do estro, esta variação pode ser fisiológica devido ao aumento das glândulas produtoras de muco ou causada por processos irritativos no útero (Clamp, 1977; Roszel & Freeman, 1988; Freeman, Roszel, Slusher, & Castro, 1990). Os detritos foram classificados em 54 citologias, sendo 29 $<25\%$, 15 entre 25 e 50% e 10 $>50\%$. Em 8 das 10 amostras em que foram considerados $>50\%$ de detritos a cultura ou citologia foram positivas, estando os detritos associados a processos de endometrite bacteriana (Ferris et al., 2015). Foram ainda encontrados

espermatozoides em 3% das citologias (3/118). Esta situação verifica-se em éguas com má *clearance* mucociliar, especialmente quando apresentam encurtamento do tempo entre ciclos éstricos, e acumulam no lúmen uterino os espermatozoides da IA ou cobertura anterior (Leblanc & Causey, 2009). Esta presença de espermatozoides pode ainda ser resultado de contaminação durante o processamento, uma vez que o lavatório utilizado para processar as amostras de LAV centrifugadas era o mesmo onde era dispensado o sémen não utilizado. Foram identificados fungos/leveduras em 6% das citologias (7/118). Estão descritas prevalências de 2 a 5%. Neste estudo a prevalência foi um pouco superior, podendo ser justificada pela tendência para o aumento da ocorrência de endometrites fúngicas e por existirem fatores predisponentes num grande número das éguas, como tratamentos repetidos e prolongados com antibióticos, éguas idosas com pneumovagina e éguas referenciadas com problemas reprodutivos (Dascanio, J.J.; Schweizer, C.; Leyt, 2001; Aguiar et al., 2005).

5.1.1. Método de recolha da amostra e resultados citológicos

As citologias feitas a partir de amostras colhidas por zaragatoa, apresentaram consideravelmente menos qualidade do que as citologias feitas pelos restantes métodos de recolha de amostras. Esta situação é justificada pelo facto das zaragatoas só recolherem a amostra de uma zona do lúmen uterino pouco representativa (1-2cm), sendo por vezes hipocelular (Leblanc, 2010; Cocchia et al. 2012; Rasmussen et al., 2015). Outro fator que influencia a qualidade das citologias feitas a partir de zaragatoas, é a pressão aplicada ao distribuir a amostra na lâmina, que ao rolar a zaragatoa sobre o vidro, destrói as células que se encontram aderentes às fibras de algodão (Cocchia et al. 2012). As citologias de amostras colhidas por lavagem de alto volume, devido à centrifugação, apresentaram uma grande quantidade de células uterinas roturadas, o que é impeditivo de avaliar o grau de lesão celular. Apesar desta limitação, as citologias mantiveram a integridade celular dos neutrófilos e restantes leucócitos, sendo possível, sem qualquer limitação, classificar as citologias como positivas ou negativas e qual o grau de severidade. A quantidade de citologias positivas foi consideravelmente maior em amostras recolhidas por lavagem de alto volume (50%) do que por zaragatoas (21%). Esta situação é explicada pelo facto da amostra colhida por lavagem de alto volume ser mais representativa de todo o útero do que as amostras por zaragatoa, que são apenas de uma zona do lúmen (LeBlanc et al., 2007; Neilsen, 2005).

5.2. Culturas

Foram realizadas no total 101 culturas microbiológicas, das quais 61% (62/101) foram positivas. Estes resultados das culturas devem ser sempre avaliados cuidadosamente e em simultâneo com o resultado das citologias, coloração de Gram e testes de oxidase e catalase, de modo a evitar resultados falso-positivos e falso-negativos. Os falso-negativos são justificados por limitação do método de recolha de amostra, por anormalidades no meio de

cultura, no processo de incubação ou má escolha do meio de cultura (Nielsen, 2005; LeBlanc & Causey, 2009). Os falso-positivos acontecem quando há contaminação da amostra. Esta contaminação pode ocorrer no processo de sementeira ou por contaminação do instrumento de recolha da amostra pelo ambiente, genitália externa ou vagina (LeBlanc et al., 2007). Foram contabilizadas 11 culturas com contaminação. De modo a evitar contaminações é importante utilizar zaragatoas com dupla proteção, sondas estéreis para a LAV, uma boa lavagem da zona perineal, utilização de luva estéril e tentar ao máximo evitar a contaminação vaginal e do cérvix cumprindo cuidadosamente os protocolos (cocchia et al. 2012). Uma forma muito eficaz de despistar falso-positivos ou falso-negativos é através da análise conjunta com a citologia. Se a cultura for positiva e a citologia positiva, existe um forte indicador de que a égua tem endometrite. Se a cultura for positiva e a citologia negativa, pode suspeitar-se de contaminação da amostra. Devemos ainda ter em consideração que, em éguas saudáveis em cio, 31% das culturas microbiológicas dão culturas positivas com o desenvolvimento de organismos não patogénicos (Hinrichs, Cummings, Sertich & Kenny, 1998). Se a cultura for negativa e a citologia positiva, pode ser simplesmente inflamação causada por outros processos que não infecciosos, como urovagina, pneumovagina ou inflamação pós-inseminação (Leblanc & Causey, 2009). Pode ainda ser resultado de infeções latentes, profundas e focais (Albihn, Baverud, & Magnusson, 2003; LeBlanc et al., 2007; Leblanc, 2010; Christoffersen et al., 2015).

O microrganismo identificado é influenciado pelo modo de reprodução praticada, pela técnica utilizada na recolha da amostra, pelo tempo entre a recolha da amostra e o processamento e pelo manuseio (Albihn et al. 2003). As bactérias mais frequentes neste estudo foram *Streptococcus* e *E.coli*. Foram também identificadas *Klebsella*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. A bactéria menos frequente foi *Enterococcus*. Estes resultados vão ao encontro de resultados obtidos em diversos estudos feitos anteriormente, em que foi estudada a frequência das bactérias isoladas a partir de éguas com endometrite (Sertich, 2007; Riddle et al. em 2007; Leblanc & Causey, 2009). Tendo em conta que a amostra foi recolhida num centro de reprodução, e as éguas utilizadas no estudo apresentavam indicadores de problemas reprodutivos, poderia ter sido encontrada uma maior prevalência de *E.coli* e de fungos, se todas as amostras fossem recolhidas por LAV, uma vez que estes microrganismos formam placas focais que a zaragatoa e a biópsia podem não atingir quando recolhem a amostra (Leblanc & Causey, 2009). A elevada ocorrência de agentes da família enterobacteriaceae, com destaque para o isolamento de *Escherichia coli*, coincide com outros estudos conduzidos na investigação da etiologia das endometrites equinas. A ocorrência destes agentes tem sido atribuída a determinados fatores predisponentes, incluindo manobras ginecológicas inadequadas, utilização de material contaminado durante as manobras reprodutivas ou defeitos anatómicos, como pneumovagina e urovagina, que favorecem a veiculação de material fecal para o trato genital das éguas (Threlfall & Immegart, 2000). Seria

expectável também uma maior prevalência de *Streptococcus* se as amostras fossem recolhidas após a inseminação, uma vez que o sémen promove a ativação de infeções latentes por esta bactéria (Rasmussen et al., 2015). Outro fator que influencia a prevalência de *S. zooepidemicus* reside na profundidade com que se instala no endométrio em éguas com infeção crónica, o que pode explicar o maior número de resultados de culturas positivas a este agente através de amostras recolhidas por biópsia, sendo este o método mais adequado para identificar esta bactéria (Petersen et al., 2015). Como neste estudo o número de biópsias foi reduzido, não foi possível verificar esta maior frequência de *S. zooepidemicus* nas culturas de amostras recolhidas por este método. O grande envolvimento do *Streptococcus* em endometrites provavelmente é justificado pelo comportamento oportunista, sendo um agente comum na pele de equinos (Quinn, Carter, Markey & Carter, 2005). As *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e alguns fungos são capazes de produzir biofilmes e estão por vezes associados a culturas e citologias negativas (LeBlanc & Causey, 2009; Beehan et al. 2015).

Para este estudo ser mais preciso, seria essencial recolher amostras em todas as éguas pelos três métodos utilizados, e de cada amostra, realizar cultura e citologia. Só assim seria possível comparar a sensibilidade de cada método de recolha de amostra na cultura e na citologia, assim como a qualidade das citologias. É notável a importância das amostras serem recolhidas sempre pelo mesmo operador e processadas também sempre pelo mesmo técnico de modo a evitar variações individuais das técnicas (Nielsen et al., 2010).

5.2.1. Cultura, citologia e método de recolha da amostra

Quando analisados os métodos de recolha de amostra e os resultados das culturas verificou-se que em culturas de zaragatoas, 57% (31/54) foram positivas e 67% (29/43) das culturas feitas a partir de amostras recolhidas por LAV foram positivas. Estes resultados não podem ser comparados diretamente, para isto ser possível, seria necessário utilizar ambos os métodos na mesma égua e fazer culturas simultâneas ou utilizar o *gold standard* em todas as amostras e comparar com os restantes resultados. O exame histológico e a cultura a partir de biópsias, são considerados o *gold standard* (Nielsen, 2005). É apenas possível afirmar que houve mais culturas positivas a partir de LAV do que por zaragatoa. Este resultado poderá ser justificado pelo facto da LAV recolher uma amostra mais representativa do útero e, para além de células, consegue ainda recolher muco e/ou exsudado (Ball, Shin, Patten, Lein, & Woods, 1988; LeBlanc et al., 2007; Leblanc, 2010; Rasmussen et al., 2015). Quando comparados os resultados das culturas e das citologias, constatou-se que em análises feitas por zaragatoa, apenas 17% (9/54) dos resultados tiveram citologia e cultura positivas, enquanto que por LAV, 33% (14/43) tiveram ambos os testes positivos. Mais uma vez, este resultado pode ser justificado pelo facto da LAV permitir uma amostra uterina mais homogénea. Por exemplo, em casos de *E.coli* e fungos, podemos ter um resultado falso-negativo, uma vez que estes formam placas focais que a zaragatoa pode não atingir (Leblanc, 2010; Rasmussen et al., 2015).

Quando comparado o número de análises em que o resultado da citologia e da cultura foram concordantes, verificou-se que ocorria em 46% (25/54) das análises feitas a partir de zaragatoas, enquanto esta percentagem é de 44% (19/43) quando se analisa os dados das amostras recolhidas por LAV. Foi ainda possível constatar que em 16% (7/43) das análises realizadas a partir de LAV, a citologia foi positiva e a cultura negativa. Esta situação não se verificou em casos em que se utilizaram zaragatoas ou biópsias. Estes dados podem apenas ser justificados pelo facto de a LAV permitir uma recolha homogénea do útero, e assim ser mais sensível a detetar inflamações que não sejam de origem infecciosa (LeBlanc, 2007). A cultura pode ser negativa pela presença de antibióticos no útero, infeções muito profundas ou irritação não infecciosa do endométrio (Overbeck et al., 2011). Em 30% (16/54) dos testes feitos a partir de zaragatoa, tanto a cultura como a citologia foram negativas. Quando se constata os resultados negativos nos dois testes para a LAV, esta percentagem desce para os 12% (5/43). Mais uma vez a justificação prende-se com o facto da zaragatoa apenas recolher uma amostra de cerca de 1-2cm do útero, podendo não ser representativa da possível infeção. Em relação às culturas que tiveram como resultado contaminação (11/101), 2 foram feitas a partir de biópsias, 7 por zaragatoa e 2 por lavagem de alto volume. O maior número de contaminações que se verificou em culturas feitas a partir de zaragatoas, pode ser justificado por contaminação ao realizar a citologia antes da cultura, apesar da lâmina estar estéril, a zaragatoa fica mais tempo exposta ao ar e já contactou com a superfície da lâmina quando é feita a cultura. Esta justificação é apenas hipotética e pouco provável pelo facto de as amostras serem processadas na câmara de fluxo laminar. Outra justificação hipotética é que a contaminação ocorra no momento em que se partem as bainhas de proteção e se colocam as borrachas estéreis na ponta.

5.2.2. Resultados da cultura e das galerias de identificação

O objetivo de realizar galerias de API® foi confirmar o diagnóstico presuntivo das culturas no meio cromogéneo. As galerias deviam ter sido feitas em todas as culturas, mas por razões económicas, restringiu-se a amostra identificada por galerias a 24 bactérias. Não foi possível congelar *Staphylococcus* e *Proteus* uma vez que, aquando da congelação de bactérias para identificação, não surgiu nenhuma cultura com estas bactérias. Uma das bactérias suspeita de *E.coli* não cresceu depois de descongelada, tanto no meio de agar sangue, como em meio líquido. Esta situação resultou provavelmente de uma falha durante o processo de congelação, que conduziu à morte bacteriana, visto que está descrito que as bactérias sobrevivem quase infinitamente quando congeladas convenientemente (Koh, 2013). A amostra que foi descartada por suspeita de contaminação pode ter sido contaminada durante o processo da congelação ou descongelação e nova repicagem, pois a pureza da cultura que deu origem à colónia congelada foi confirmada (Koh, 2013; Tudú & Bengal, 2016).

O caso suspeito de *Proteus*, em que foi identificada *E.coli*, resultou de uma falha na leitura do teste da oxidase, pois este teste mudava de cor aos 12 segundos (é positivo se mudar de cor antes dos 10 segundos) o que deixou algumas dúvidas e conduziu a este erro. O caso suspeito de *Pseudomonas*, em que se identificou *Klebsiella*, deve ser resultado de uma má identificação presuntiva ou por tempo insuficiente de incubação.

Recorrendo à estatística foi possível afirmar que existe uma correlação estatística entre os resultados das galerias de identificação e as culturas. Contudo, não devem ser dispensados os testes da oxidase, catálase e coloração de Gram, pois aumentam as certezas quanto ao agente isolado. Esta correlação permite, com alguma cautela, fazer uma extrapolação para os resultados encontrados nas restantes placas cromogêneas em que não foi feita a identificação com as galerias de API®. Esta extrapolação deve ser feita com um espírito crítico e cruzando com os sinais clínicos, história clínica e resultados dos restantes testes.

5.3. Resultado reprodutivo e resultado dos testes laboratoriais

Verificou-se uma correlação estatisticamente significativa ($p\text{-value} = 0.00004248$) entre os resultados reprodutivos e os testes laboratoriais considerados válidos (cultura e citologia ambos positivos ou negativos). Quando os resultados laboratoriais foram semelhantes, 53 % (24/45) das éguas tiveram um resultado reprodutivo positivo, enquanto em 47% (21/45) dos casos acima descritos, o resultado reprodutivo foi negativo. Nos casos em que ambos os resultados foram negativos e não receberam tratamento, 57% tiveram um resultado positivo. Riddle, LeBlanc e Stromberg (2007) quando comparam os resultados das citologias e culturas microbiológicas, obtiveram 60% de taxa de sucesso reprodutivo quando ambos os resultados eram negativos. Este resultado é bastante próximo do obtido neste estudo (57%). Quando ambos os testes foram positivos e as éguas receberam tratamento direcionado para a bactéria isolada em 50% o resultado reprodutivo foi positivo. No estudo anteriormente referido, os autores não realizaram qualquer tratamento quando ambos os resultados foram positivos, obtendo uma taxa de prenhes de 12% (18/146) (Riddle et al., 2007). Estes resultados permitem constatar que o correto diagnóstico e o tratamento direcionado para o agente isolado são fundamentais para o sucesso reprodutivo. 47% (21/45) dos resultados reprodutivos considerados neste estudo, foram negativos. Riddle, LeBlanc e Stromberg (2007) no seu estudo, obtiveram 44% de insucesso reprodutivo. Sendo a Embriovet um centro de reprodução equino de referência, uma parte considerável das éguas que são encaminhadas para as instalações têm problemas reprodutivos. Uma parte considerável das éguas que se encontravam no centro, e sobretudo das éguas que foram sujeitas a testes microbiológicos, foram éguas alfeiras ou com historial de endometrite e infertilidade. Cerca de 58% (59/101) das éguas deste estudo, tinham registo de problemas reprodutivos de épocas anteriores. A somar a esta percentagem acrescem as éguas sem historial reprodutivo e éguas referenciadas como problemáticas por colegas médico-veterinários. Com isto, e como não

foram realizadas biópsias nem TSA a todas as éguas para despistar casos de endometriose e de bactérias multirresistentes e não foram tidos em outros fatores é provável, não só que estas éguas tenham bactérias multirresistentes em consequência dos inúmeros tratamentos a que foram sujeitas, como casos de endometriose e ainda má fertilidade do sémen entre outros fatores. Os isolados de endometrite apresentam cerca de 20% de resistência, in vitro, para os antimicrobianos de indicação clássica para o tratamento de afeções uterinas (Aguiar et al., 2005).

5. Conclusão

De acordo com os objetivos propostos, após a realização deste trabalho foi concluído que:

- Existiu uma correlação estatisticamente significativa entre os resultados das galerias de identificação e os resultados presuntivos das culturas nas placas cromogêneas.
- A citologia tem um elevado valor diagnostico para urovagina e infeções fúngicas.
- A utilização da análise microbiológica e citológica conjugada permite um resultado mais fiável e a identificação de resultados falso-positivos e falso-negativos.
- As amostras recolhidas por zaragatoa dão origem a citologia de pior qualidade do que as recolhidas por LAV e biópsia.
- Existe uma correlação estatisticamente significativa entre os casos em que os resultados laboratoriais são concordantes (citologia e cultura microbiológica, ambos positivos ou negativos) e os resultados reprodutivos.
- É crucial a correta identificação do agente da endometrite e o tratamento, mesmo que presuntivo, direcionado para esse agente.

Após a conclusão final, revela-se imprescindível uma cuidada esterilização do material e no processamento das amostras de modo a diminuir as contaminações e consequentemente os resultados falso-positivos. É também crucial a conjugação da análise microbiológica com a citológica e analisar os resultados com um espírito crítico, cruzando sempre com a historia clínica da égua, sinais clínicos e com os tratamentos anteriormente aplicados.

Sugere-se o uso da LAV ou biópsia como técnicas de recolha de amostras para citologia e cultura, devido à sua fácil realização e maior sensibilidade. As desvantagens destes métodos são que a lavagem uterina e a biópsia por si só constituem um maior estímulo irritante para o endométrio.

Contudo, dada a elevada casuística observada neste centro de reprodução, com uma elevada carga de trabalho num período de tempo concentrado, e os custos e trabalho que a realização de mais do que um método de recolha de amostra implicaria, nem sempre é possível a realização de mais do que um método de recolha de amostra e diagnóstico. Para além da componente financeira, o tempo despendido no envio e processamento das amostras num laboratório externo não é muitas vezes conciliável com uma tomada de decisão que tem de ser rápida, dado o curto período de tempo disponível para melhorar o ambiente uterino antes

da chegada do embrião. Adicionalmente, este centro tem como prioridade maximizar a saúde e eficiência reprodutiva das éguas, reduzindo as falhas da concepção. Para tal, a opção de tratamento foi específica para cada égua, tendo em consideração a história reprodutiva da mesma e o resultado da culturas e citologias. No final deste estudo, confirmou-se a importância da utilização das placas bipartidas com o meio cromogéneo e da análise citológica, que permitiram um diagnóstico precoce e a instauração de um tratamento adequado das endometrites o que é imprescindível na redução do impacto económico das mesmas.

Os resultados foram bastantes promissores, existindo uma boa correlação entre os resultados das placas cromogéneas e os resultados das galerias de identificação. Eventualmente, serão necessários mais estudos com uma maior quantidade de culturas validadas por galeria de identificação.

PARTE IV: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Aguiar, D. M. De, Ribeiro, M. G., Ueno, T. E., Paes, A. C., Megid, J., & Paulista, U. E. (2005). Etiologia e sensibilidade in vitro de microrganismos, 107–109.
- Albihn, A., Baverud, V., & Magnusson, U. (2003). Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44(3–4), 121–129.
- Alvarenga, M. A. (2008). Diagnóstico e tratamento de Endometrite Fúngica em Éguas. In *IX Conferência anual da abraveq*.
- Amaral, A., Fernandes, C., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Baclawska, A., Rebordão, M. R., Ferreira-Dias, G. (2018). Elastase inhibition affects collagen transcription and prostaglandin secretion in mare endometrium during the estrous cycle. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(June).
- Ball, B. A., Shin, S. J., Patten, V. H., Lein, D. H., & Woods, G. L. (1988). Use of a low-volume uterine flush for microbiologic and cytologic examination of the mare's endometrium. *Theriogenology*, 29(6), 1269–1283.
- Beehan, D. P., Wolfsdorf, K., Elam, J., Krekeler, N., Paccamonti, D., & Lyle, S. K. (2015). The Evaluation of Biofilm-Forming Potential of *Escherichia coli* Collected From the Equine Female Reproductive Tract. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(11–12), 935–939.
- Berends, E.T.M., Horswill, A.R., Haste, N.M., Monestier, M., Nizet, V., von Kockritz-Blickwede, M., 2010. Nuclease expression by *Staphylococcus aureus* facilitates escape from neutrophil extracellular traps. *J. Innate Immun.* 2, 576–586.
- Bohn, A. A., Ferris, R. A., & McCue, P. M. (2014). Comparison of equine endometrial cytology samples collected with uterine swab, uterine brush, and low-volume lavage from healthy mares. *Veterinary Clinical Pathology*, 43(4), 594–600.
- Bracher, V., Mathias, S., & Allen, W. R. (1992). Videoendoscopic evaluation of the mare's uterus: II. Findings in subfertile mares. *Equine Veterinary Journal*, 24(4), 279–284.
- Brinsko, S., Blanchard, T., Schumacher, J., Varner, D. & Love, C. (2011). *Manual of equine reproduction* (3rd ed.). Philadelphia, PA, USA: Mosby/Elsevier.
- Brinsko, S. P., Sertich, P. L. (2014). The use of endometrial biopsies in formulating a treatment

plan. Society for Theriogenology 2013 Annual Conference.

- Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., Staroniewicz, Z., & Siemieniuch, M. J. (2014). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 1–6.
- Card, C. (2005). Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares, *Theriogenology*, vol.64, pp. 580–588.
- Cardario, M. E., Thatcher, M. J. D., & Lemblanc, M. M. (1995). Relation between prostaglandin and uterine clearance of radiocolloid in the mare. *Biol Reprod Mono*, 1(August), 495–500.
- Caslick E. A. (1937). The vulva and vulvovaginal orifice and its relation to genital health of the Thoroughbred mare. *Cornell Vet* 27, 178-187.
- Causey, R. C. (2006). Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. *Veterinary Journal*, 172(3), 405–421.
- Causey, R. C. (2007). Mucus and the mare: How little we know. *Theriogenology*, 68(3), 386–394.
- Causey, R. C., Miletello, T., O'Donnell, L., Lyle, S. K., Paccamonti, D. L., Anderson, K. J., ... LeBlanc, M. M. (2008). Pathologic effects of clinical uterine inflammation on the equine endometrial mucosa. *AAEP Proceedings*, 54, 276–277.
- Christoffersen, M., Söderlind, M., Rudefalk, S. R., Pedersen, H. G., Allen, J., & Krekeler, N. (2015). Risk factors associated with uterine fluid after breeding caused by *Streptococcus zooepidemicus*. *Theriogenology*, 84(8), 1283–1290.
- Christoffersen, M., Woodward, E., Bojesen, A. M., Jacobsen, S., Petersen, M. R., Troedsson, M. H. T., & Lehn-jensen, H. (2012). Inflammatory responses to induced infectious endometritis in mares resistant or susceptible to persistent endometritis. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 41.
- Chrysanthopoulou, A., Mitroulis, I., Apostolidou, E., Arelaki, S., Mikroulis, D., Konstantinidis, T., Kambas, K. (2014). Neutrophil extracellular traps promote differentiation and function of fibroblasts. *Journal of Pathology*, 233(3), 294–307.
- Clamp, J. R. (1977). Mucus in health and disease. University of Bristol, New york.

- Cocchia, N., Paciello, O., Auletta, L., Uccello, V., Silvestro, L., Mallardo, K., ... Pasolini, M. P. (2012). Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 77(1), 89–98.
- Couto, M. A., & Hughes, J. P. (1984). Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, 4(6), 265–273.
- Dascanio, J. (2011). How and When to Treat Endometritis With Systemic or Local Antibiotics. *AAEP Proceedings*, vol.57, pp. 24–31.
- Dascanio JJ (2011b) "External Reproductive Anatomy" in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) *Equine Reproduction*, 2nd edition, Wiley-Blackwell, 1577-1581
- Dascanio, J.J.; Schweizer, C.; Leyt, W. B. (2001). Equine fungal endometritis, 14, 39–50.
- Dascanio, J., Ley, W., & Schweizer, C. (2000). How to diagnose and treat fungal endometritis. *AAEP Proceedings*, 46, 316–318.
- Davies Morel, M. C. G., Lawlor, O., & Nash, D. M. (2013). Equine endometrial cytology and bacteriology: Effectiveness for predicting live foaling rates. *Veterinary Journal*, 198(1), 206–211.
- Davies Morel, M. C. G., & Newcombe, J. R. (2008). The efficacy of different hCG dose rates and the effect of hCG treatment on ovarian activity: Ovulation, multiple ovulation, pregnancy, multiple pregnancy, synchrony of multiple ovulation; in the mare. *Animal Reproduction Science*, 109(1–4), 189–199.
- Defontis, M., Vaillancourt, D., & Grand, F. X. (2011). Comparison of three methods of sampling for endometrial cytology in the mare: Preliminary study. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*, vol.39, pp. 171–175.
- Diel, M., Amorim, D., Gartley, C. J., Foster, R. A., Hill, A., Scholtz, E. L., Chenier, T. S. (2016). Comparison of clinical signs, endometrial culture, endometrial cytology, uterine low-volume lavage and uterine biopsy and combinations in the diagnosis of equine endometritis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 44, 54–61.
- Digby, N. J. W. (1978). The Technique and Clinical Application, *Equine veterinary journal* 10, 167–170.

- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15(2), 167–19.
- Doty, A., Buhi, W. C., Benson, S., Scoggin, K. E., Pozor, M., Macpherson, M., ... Troedsson, M. H. T. (2011). equine crisp3 modulates interaction between spermatozoa and polymorphonuclear neutrophils¹. *Biology of Reproduction*, 85(1), 157–164.
- Easley, J. K. (1988). Diagnosis and treatment of vesicovaginal reflux in the mare. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 4(3).
- Evans, M. J., Hamer, J. M., Gason, L. M., Graham, C. S., Asbury, A. C., & Irvine, C. H. G. (1986). Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment. *Theriogenology*, 26(1), 37–50.
- Ferreira-Dias, G. M., Nequin, L. G., & King, S. S. (1999). Morphologic comparisons among equine endometrium categories I, II, and III, using light and transmission electron microscopy. *American Journal of Veterinary Research*, 60(1), 49–55.
- Ferreira, J. C., Ignácio, F. S., Rocha, N. S., Thompson, D. L., Pinto, C. R., & Meira, C. (2015). Real-time characterization of the uterine blood flow in mares before and after artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, 160, 90–96.
- Ferris, R. A., Bohn, A., & Mccue, P. M. (2015). Equine endometrial cytology: Collection techniques and interpretation, 1–7.
- Fraga, M., Perelmuter, K., Delucchi, L., Cidade, E., & Zunino, P. (2008). Vaginal lactic acid bacteria in the mare: Evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 93(1–2), 71–78.
- Freeman, K. P., Roszel, J. F., Slusher, S. H., & Castro, M. (1990). Variation in glycogen and mucins in the equine uterus related to physiologic and pathologic conditions. *Theriogenology*, 33(4), 799–808.
- Hemberg, E., Lundeheim, N., & Einarsson, S. (2005). Retrospective study on vulvar conformation in relation to endometrial cytology and fertility in thoroughbred mares.

Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine, 52(9), 474–477.

Hinrichs, K., Cummings, M. R., Sertich, P. L. & Kenney R. M. (1998). Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule, and clitoral fossa of clinically normal mares. *J. A. Vet. Med. Ass.* 193, 72-75.

Hoffmann, C. (2006). Morphologisch-funktionelle untersuchungen zur pathogenese der equinen endometrose unter besonderer berucksichtigung endometrialer proteine und kohlenhydrate. Institut fur veterinar-pathologie der Universitat Leipzig.

Hurtgen, J. P. (2006). Pathogenesis and treatment of endometritis in the mare: A review. *Theriogenology*, vol.66, pp. 560–566.

Katila, T. (1995). Onset and duration of uterine inflammatory response in mare after insemination with fresh semen. *Biol.Reprod. Mono*, 1(August), 515–518.

Katila, T. (1996). Uterine defence mechanisms in the mare. *Animal Reproduction Science*, 42(1–4), 197–204.

Kenney, R. (1978). Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol.172, pp. 241–62.

Kenney, R. & Doig, P. (1986). Equine endometrial biopsy. In *Current Therapy in Theriogenology* (pp. 723–729). Philadelphia: Saunders Company.

Kilgenstein, H. J., Schöniger, S., Schoon, D., & Schoon, H. (2015). Research in Veterinary Science Microscopic examination of endometrial biopsies of retired sports mares: An explanation for the clinically observed subfertility? *Research in Veterinary Science*, 99, 171–179.

Klein, C., Ennen, S., Huchzermeyer, S., Weiss, R., Wehrend, A., 2009. Analysis of the barrier function of vulvovaginal fold and cervix to ascending bacterial contamination of the mare's reproductive tract. *Tierarztl Prax* 2, 113-117.

Knudsen O. (1964). Partial dilatation of the uterus as a cause of sterility in the mare. *Cornell Vet*; 54.423-438.

- Koblischke, P., Kindahl, H., Budik, S., Aurich, J., & Palm, F. (2008). Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs, *70*, 1147–1158.
- Koh, C. M. (2013). *Storage of bacteria and yeast. Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 533). Elsevier Inc. 236-240
- Kotilainen, T., Huhtinen, M., & Katila, T. (1994). Sperm-induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*, *41*(3), 629–636.
- Kozdrowski, R., Sikora, M., Buczkowska, J., Nowak, M., Raś, A., & Dzieciol, M. (2015). Effects of cycle stage and sampling procedure on interpretation of endometrial cytology in mares. *Animal Reproduction Science*, *154*, 56–62.
- LeBlanc, M. (2003). Persistent mating induced endometritis in the mare: Pathogenesis, diagnosis and treatment. In B. A. Ball (Ed.), *Recent Advances in Equine Reproduction*. Ithaca: International Veterinary Information Service
- Leblanc, M. M. (2010). Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post – Mating-Induced Endometritis in the Mare, *45*, 21–27.
- LeBlanc, M. M. (1994). Oxytocin enhances clearance of radiocolloid from the uterine lumen of reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis, *27*, 247–256.
- Leblanc, M. M., & Causey, R. C. (2009). Clinical and Subclinical Endometritis in the Mare : Both Threats to Fertility Physical Uterine Clearance – the Critical Defence against Endometritis, *44*, 10–22.
- LeBlanc, M. M., Johnson, R. D., Calderwood Mays, M. B., & Valderrama, C. (1995). Lymphatic Clearance of India Ink in Reproductively Normal Mares and Mares Susceptible to Endometritis¹. *Biology of Reproduction*, *52*(monograph_series1), 501–506.
- LeBlanc, M. & McKinnon, A. (2011). Breeding the Problem Mare. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.), *Equine Reproduction* (2nd ed., pp. 2620–2639). WileyBlackwell.
- LeBlanc, M. M., Magsig, J. & Stromberg, A. J. (2007). Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, *vol.68*, pp. 403–412.

- LeBlanc, M. M., Magsig, J., & Stromberg, A. J. (2007). Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, 68(3), 403–412.
- Lehmann, J., Ellenberger, C., Hoffmann, C., Bazer, F. W., Klug, J., & Allen, W. R. (2011). Morpho-functional studies regarding the fertility prognosis of mares suffering from equine endometrosis. *THE*, 76(7), 1326–1336.
- Liu, I. K. M., & Troedsson, M. H. T. (2008). The diagnosis and treatment of endometritis in the mare : Yesterday and today, 70, 415–420.
- McCue, P. M. (2008). The Problem Mare: Management Philosophy, Diagnostic Procedures, and Therapeutic Options. *Journal of Equine Veterinary Science*, 28(11), 619–626.
- McCue P. M. & Bishop J. (2014). Microbiology: Microbial culture In Descanio J. & McCue P. *Equine reproductive procedures* (1st ed., 244-250)
- Møller Nielsen, J., Høgsberg Nielsen, F., & Rønn Petersen, M. (2012). Diagnostik der Endometritis beim Pferd – Mikrobiologie, Zytologie und Histologie von Endometriumsbiopsien und Korrelation mit der Fruchtbarkeit. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 28(1), 8–13.
- Nielsen, H. J. (2005). New media and new roles of librarianship: Illustrated by a literary website of Danish libraries. *New Library World*, 106(11–12), 510–518.
- Nielsen, J. M., Troedsson, M. H., Pedersen, M. R., Bojesen, A. M., Lehn-Jensen, H., & Zent, W. W. (2010). Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium: Comparison of Results Obtained by Swabs and Biopsies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(1), 27–30.
- Nikolakopoulos, E., & Watson, E. D. (1999). Uterine contractility is necessary for the clearance of intrauterine fluid but not bacteria after bacterial infusion in the mare. *Theriogenology*, 52(3), 413–423.
- OIE (2012) “Criteria for the inclusion of diseases, infections and infestations on the OIE list” in Terrestrial Animal Health Code, 1-6
- Olman, M. A. (2009). Beyond TGF- β : A prostaglandin promotes fibrosis. *Nature Medicine*,

15(12), 1360–1361.

Overbeck, W., Jäger, K., Schoon, H. A., & Witte, T. S. (2013). Comparison of cytological and histological examinations in different locations of the equine uterus-an in vitro study. *Theriogenology*, 79(9), 1262–1268.

Overbeck, W., Witte, T. S., & Heuwieser, W. (2011). Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. *Theriogenology*, 75(7), 1311–1318.

Palm, F., Walter, I., Budik, S., Kolodziejek, J., Nowotny, N., & Aurich, C. (2008). Influence of different semen extenders and seminal plasma on PMN migration and on expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α and COX-2 mRNA in the equine endometrium. *Theriogenology*, 70(5), 843–851.

Papa, F. O., Melo, C. M., Monteiro, G. A., Papa, P. M., Guasti, P. N., Maziero, R. R. D., ... Martin, I. (2014). Equine perineal and vulvar conformation correction using a modification of pouret's technique. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(3), 459–464.

Pascoe R. R. (1979) Observations on the length and angle of declination of the vulva and its relation to fertility in the mare. *J Reprod Fertil Suppl*(27), 299

Petersen, M., Nielsen, J., Lehn-Jensen, H., & Bojesen, A. (2009). Streptococcus equi subspecies zooepidemicus resides deep in the chronically infected endometrium of mares. *Clinical Theriogenology*, 1(August), 393–409.

Petersen, M. R., Skive, B., Christoffersen, M., Lu, K., Nielsen, J. M., Troedsson, M. H. T., & Bojesen, A. M. (2015). Activation of persistent Streptococcus equi subspecies zooepidemicus in mares with subclinical endometritis. *Veterinary Microbiology*, 179(1–2), 119–125.

Pugh, D.G., Bowen, J.M., Kloppe, L.H. and Simpson, R.B. (1986) Fungal Endometritis in Mares. *Comp. cont. Educ. pract. Vet.* 8, S173-S181.

Pycock, J. F. (2006). How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare. *AAEP Proceedings*, 52(August), 245–249. Retrieved from

Pycock JF. Breeding management of the problem mare. In: Samper JC, editor. Equine breeding management and artificial insemination. St. Louis, MO: Saunders; 2009. p. 139–64.

- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. K. & Carter, G. R. (1994). Bacterial pathogens; microscopy, culture and identification. Carter Wolfe Publishing (Eds), *clinical veterinary microbiology* (1st ed., Capítulo 4)
- Rasmussen, C. D., Petersen, M. R., Bojesen, A. M., Pedersen, H. G., Lehn-Jensen, H., & Christoffersen, M. (2015). Equine Infectious Endometritis-Clinical and Subclinical Cases. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(2), 95–104.
- Rebordão, M. R., Amaral, A., Lukasik, K., Szóstek-Mioduchowska, A., Pinto-Bravo, P., Galvão, A., ... Ferreira-Dias, G. (2018). Constituents of neutrophil extracellular traps induce in vitro collagen formation in mare endometrium. *Theriogenology*, 113, 8–18.
- Rebordão, M. R., Carneiro, C., Alexandre-Pires, G., Brito, P., Pereira, C., Nunes, T., ... Ferreira-Dias, G. (2014). Neutrophil extracellular traps formation by bacteria causing endometritis in the mare. *Journal of Reproductive Immunology*, 106, 41–49.
- Ricketts, S. W. (2011). microbiology cultures techniques and interpretation. In A.O. McKinnon, E.L. Squires, W.E. Vaala e D.D. Varner (eds). *Equine reproduction*. Wiley Blackweell, West Sussex. Pp 1963-1978.
- Riddle, W. T., LeBlanc, M. M., & Stromberg, A. J. (2007). Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, 68(3), 395–402.
- Rigaill, J., Verhoeven, P. O., Mahinc, C., Jeraiby, M., Grattard, F., Fonsale, N., ... Carricajo, A. (2015). Evaluation of new bioMérieux chromogenic CPS media for detection of urinary tract pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2701–2702.
- Roszel, J. F., & Freeman, K. P. (1988). Equine endometrial cytology. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 4(2), 247–262.
- Scarpato, C., Piccoli, P., Ricordi, P., & Scagnelli, M. (2002). Comparative evaluation of two commercial chromogenic media for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 21(4), 283–289. <https://doi.org/10.1007/s10096-002-0718-0>
- Sertich, P. L. (2007). Intrauterine diagnostic procedures. In J. Samper, J. Pycock, & A.

- McKinnon (Eds.), *Current therapy in equine reproduction* (pp. 36–43). Saunders Elsevier.
- Sikora, M., Król, J.J., Nowak, M., Stefaniak, T., Aubertsson, G. & Kozdrowski, R. (2016). The usefulness of uterine lavage and acute phase protein levels as a diagnostic tool for subclinical endometritis in Icelandic mares. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol.58, pp.1–10.
- Sinnemaa, L., Järvinen, T., Lehmonen, N., Mäkelä, O., Reilas, T., Sankari, S., & Katila, T. (2005). Effect of insemination volume on uterine contractions and inflammatory response and on elimination of semen in the mare uterus - Scintigraphic and ultrasonographic studies. *Journal of Veterinary Medicine Series A: Physiology Pathology Clinical Medicine*, 52(9), 466–471.
- Snider, T. A., Sepoy, C., & Holyoak, G. R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: Observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, 75(9), 1567–1581. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.013>
- Stout, T. A. E. (2008). Fungal endometritis in the mare. *Pferdeheilkunde*, 24(1), 83–85.
- Tibary A, Fite, CL (2007) “Reproductive Tract Infections” in Sellon DC, Long MT Equine Infectious Diseases, Saunders Elsevier, 84-103
- Thornbury, R. S. (1975). Diseases of the vulva, vagina and cervix of the thoroughbred mare. *New Zealand Veterinary Journal*, 23(11), 277–280.
- Threlfall, W. R. & Immergart H. M.(2000). Doença uterine e tratamento. In: Reed, S. M. & Bayly, W. M. (eds). *Medicina interna equina*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, P.666-671.
- Troedsson, M. H. T. (1997). Therapeutic considerations for mating-induced endometritis. *Pferdeheilkunde Equine Medicine*, 13(5), 516–520.
- Troedsson, M. H. T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare, (93).
- Troedsson, M. H. T. (2006). Breeding-Induced Endometritis in Mares, 22, 705–712.
- Troedsson, M. (2011). Endometritis. In A. McKinnon, E. Squires, W. Vaala, & D. Varner (Eds.),

- Troedsson, M. H. T., Liu, K. M., Ing, M., Pascoe, J. & Thurmond, M. (1993). Multiple site electromyography recordings of uterine activity following an intrauterine bacterial challenge in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection.
- Troedsson, M. & Liu, I. (1991). Uterine clearance of non-antigenic markers (⁵¹Cr) in response to a bacterial challenge in mares potentially susceptible and resistant to chronic uterine infections. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol.44, pp. 283–288.
- Troedsson, M. H. T., Loset, K., Alghamdi, A. M., Dahms, B., & Crabo, B. G. (2001). Interaction between equine semen and the endometrium: The inflammatory response to semen. *Animal Reproduction Science*, 68(3–4), 273–278.
- Trotora G. J., Funke B. R. Case C. L. (1998). Functional anatomy of procaryotic and eucaryotic cells. In: Microbiology, an Introduction, Addison Wesley Longman, Inc., Menlo Park. pp 76-111.
- Trotter, G. W., M. A. O. (1988). Surgery of abnormal vulvar and perineal conformation in the mare.
- Tudu, N., & Bengal, W. (2016). Selection of Storage Methods for Maintenance of Different Stock Cultures, 5(10), 1097–1104.
- Varner D.V., Blanchard T. L. (1990) “An update on uterine defense mechanisms in the mare” *Equine Veterinary Science* 10, 169-175
- Walter, Jasmin; Neuberg, Klaus-Peter; Failing, Klaus; Wehrend, A. (2012). Cytological diagnosis of endometritis in the mare : investigations of sampling Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results Corresponding Author : Birkhof Stud , D 73072, 132, 178–186.
- Walter, I., Handler, J., Reifinger, M., & Aurich, C. (2001). Association of endometrosis in horses with differentiation of periglandular myofibroblasts and changes of extracellular matrix proteins. *Reproduction*, 121(4), 581–586.
- Walter, J., Neuberg, K. P., Failing, K., & Wehrend, A. (2012). Cytological diagnosis of endometritis in the mare: Investigations of sampling techniques and relation to

bacteriological results. *Animal Reproduction Science*, 132(3–4), 178–186.

Watson, E. D., Stokes, C. R. & Bourne, F. J. (1987). Cellular and humoral defence mechanisms in mares susceptible and resistant to persistent endometritis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol.16,pp. 107–121.

Wittenbrink, M. M., & Hoelzle, K. (2008). What ' s new in bacteriology of the mare ' s genital tract, 24, 53–55.

Anexos

Anexo I – Ficha microbiológica das éguas



DATA: __/__/__

Microbiologia Éguas FICHA TÉCNICA

Nome do animal: _____ Proprietário: _____

História clínica: _____

Aspetos físicos: _____

Aspetos ecográficos: _____

Avaliação macroscópica				
Fluido			Zaragatoa	
Limpo	Detritos	Mucoso	Limpa	Detritos
Pellet			Biópsia	

Leitura da cultura:

	Nº de colónias
18h	
24h	
48h	

* Positiva quando se formam mais de 4 colónias.

** Contaminação quando existem mais de 3 microrganismos presentes na placa.

Resultados Laboratoriais:

Cultura	Citologia
Coloração Gram	

Terapêutica:

Protocolo Citologia

As lâminas utilizadas para fazer citologias antes das culturas devem ser esterilizadas.

Material:

- Lâminas de microscópio;
- Lamparina
- Pinça
- Ansa metálica
- Corante (Diff-Quick)

Procedimento

Zaragatoa:

1. Retirar a lâmina estéril do involucro com a pinça previamente esterilizada na chama;
2. Abrir a zaragatoa à chama, sem a retirar da protecção;
3. Fazer rolar a zaragatoa ao longo do comprimento da lâmina;
4. Fechar a protecção da zaragatoa;
5. Secar a lâmina à chama.

Lavagem de baixo volume:

1. Retirar cerca de 20ml do lavado e colocar num tubo de falcon;
2. Centrifugar a 1580 rpm (410G), 10 minutos;
3. Retirar o sobrenadante e homogeneizar o pellet com a ansa;
4. Retirar 1µ com a ansa e distribui-lo pela lâmina;
5. Secar a lâmina à chama.

Esta técnica leva a um aumento dos artefactos na citologia (células lesionadas, ruturadas, etc).

Biópsia:

1. Colocar a biópsia sobre a lâmina durante 5 minutos, perto da chama;
2. Ao fim dos 5 minutos, fazer deslizar a biópsia com a pinça pela lâmina uma única vez;
3. Secar à chama.

Leitura e Interpretação:

A avaliação deve ser sistemática.

Inicialmente deve ser observada nas objectivas de 4x e 10x para verificar se tem uma quantidade de células epiteliais adequada. Deve ser avaliada posteriormente na objectiva de 100x com óleo de imersão.

Devem ser identificadas PMN's, glóbulos vermelhos, bactérias e fungos para além das células epiteliais uterinas.

Citologias com + de 1 PMN por cada 10 células epiteliais é endometrite.

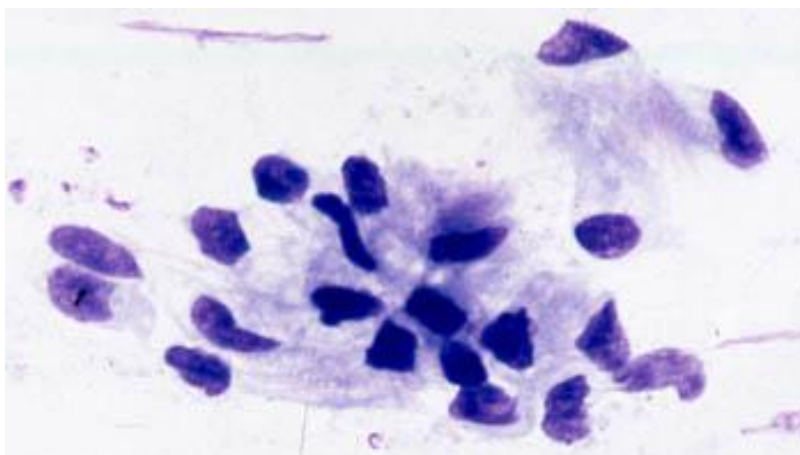
Tipos de células:

- Células epiteliais uterinas

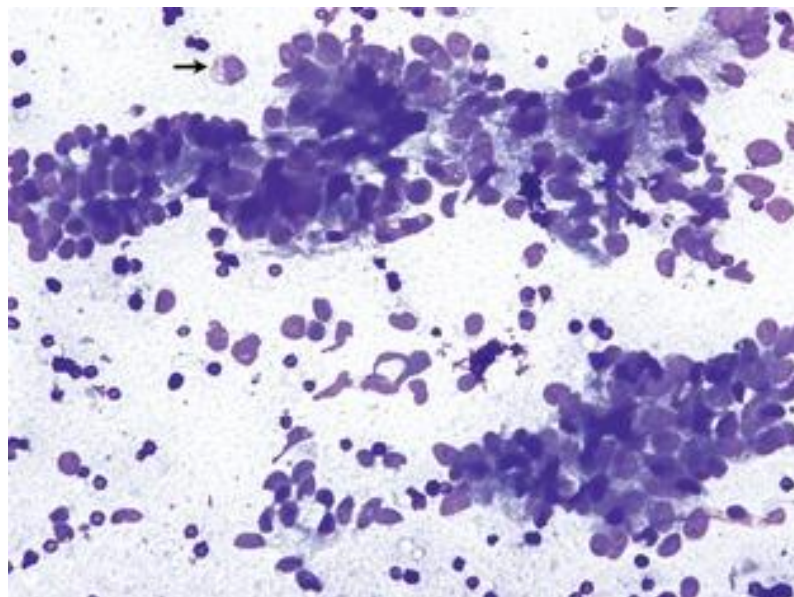
As células uterinas variam de forma cubóide no anestro a colunar no estro. A maioria das UECs não são ciliadas, mas podem ser observadas na citologia. Deve ser avaliado rácio de células intactas e rupturadas.

As células escamosas são raras de observar, aparecem mais frequentemente em éguas em fase de pós-parto ou éguas que fazem refluxo de urina para o útero. Estas células são típicas de contaminação vaginal.

Um grande número de células epiteliais danificadas pode indicar má técnica na preparação da amostra, manuseamento ou manuseio antes da coloração ou infecção uterina crónica.

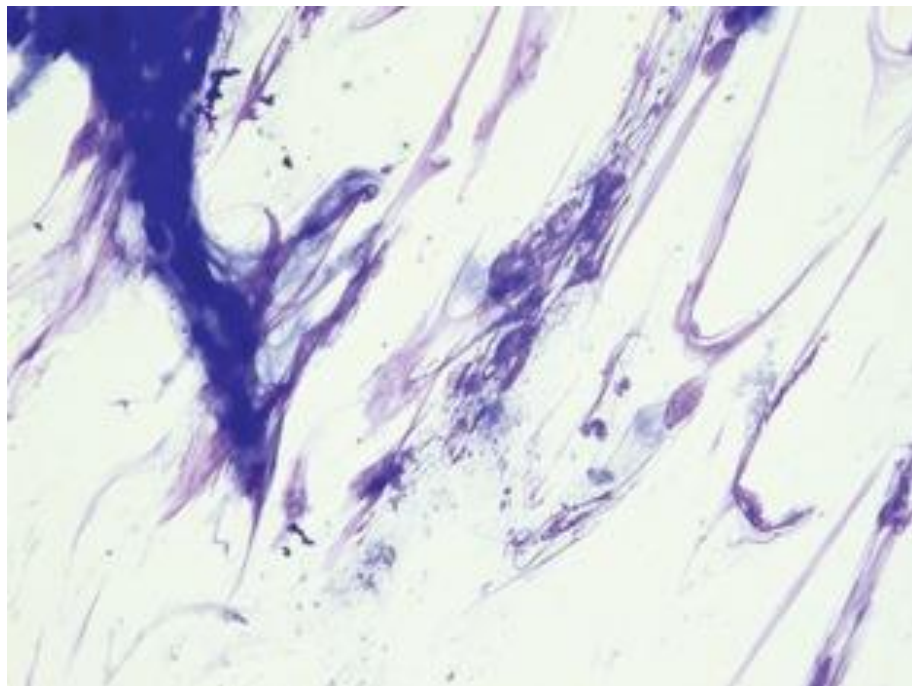


Células epiteliais uterinas, sem inflamação

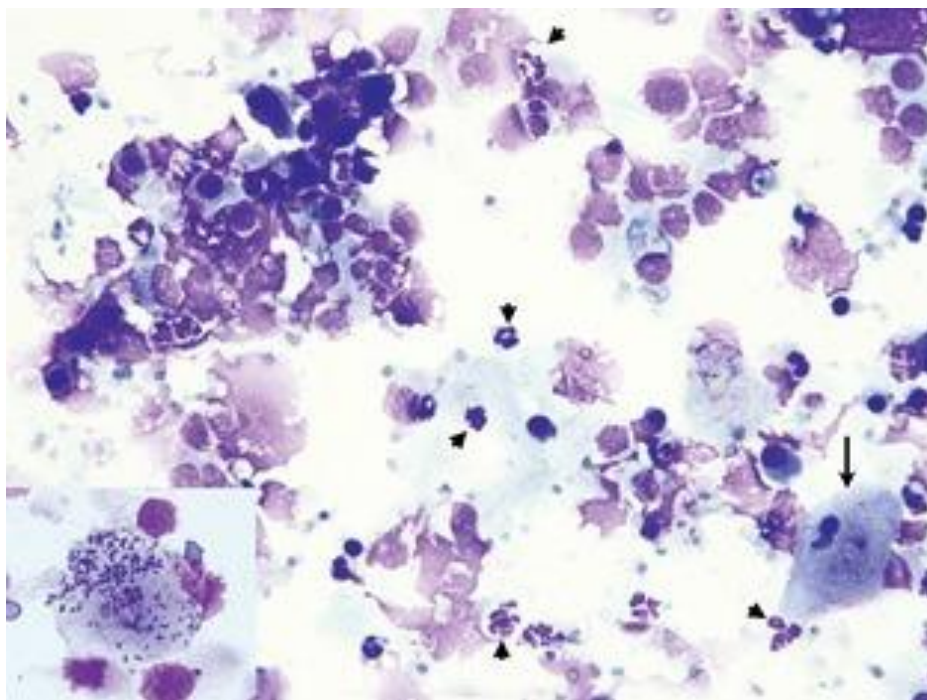


Amostra de boa qualidade. As células endometriais são frequentemente vistas em aglomerado e muitas vezes rupturadas quando individualizadas.

Fundo granular está frequentemente presente. A seta aponta um linfócito raro.40x



Células rupturadas. Os detritos nucleares impedem a avaliação da morfologia celular.



Citologia de uma lavagem de baixo volume, concentrada por centrifugação.

As células endometriais está frequentemente lesadas enquanto que as células inflamatórias se mantêm intactas (setas pequenas).

As bactérias estão muitas vezes associadas a células de escamação (seta grande e imagem no canto).

- Leucócitos

Os neutrófilos são os PMN's mais comumente identificados nas citologias. Uma amostra recolhida durante o estro deve ter poucos PMN's, a presença dos mesmos pode indicar uma pequena presença de sangue com origem no processo de recolha. Os neutrófilos estão presentes no lúmen após a inseminação, uma lavagem ou infusão, no período pós-parto e endometrites.

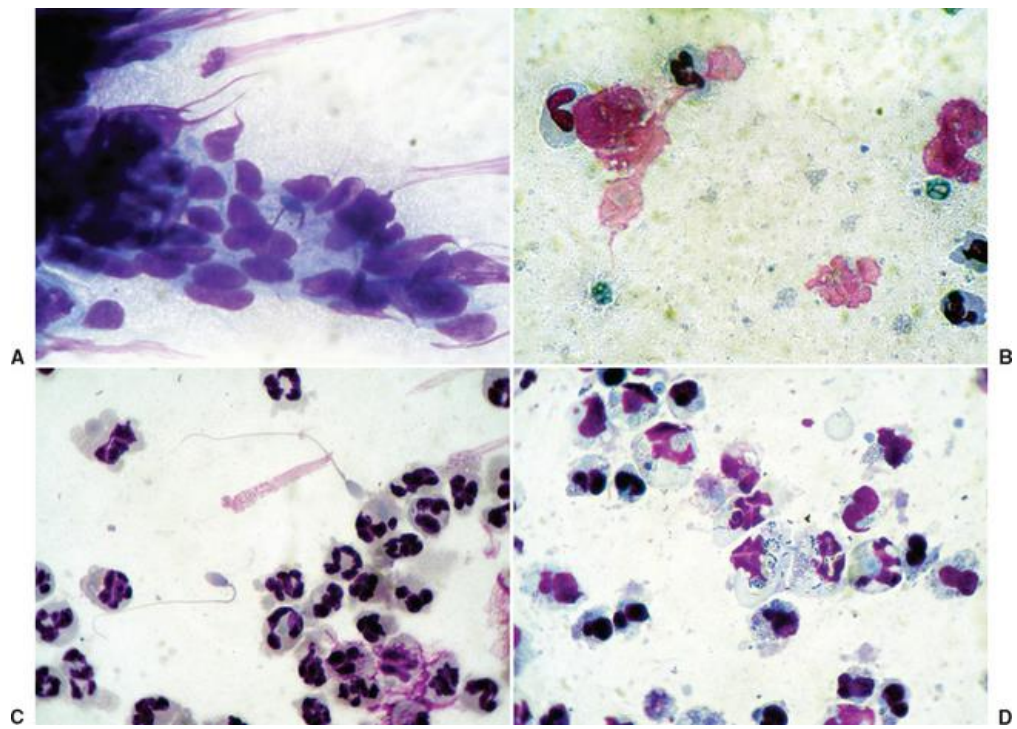
Macrófagos e linfócitos são encontrados nos primeiros dias pós-parto ou em infecções uterinas crónicas. Eosinófilos são encontrados em casos de pneumovagina, infecções fúngicas e refluxo de urina para o útero.

O rácio WBC/hpf é determinado após avaliar pelo menos 10 campos em diferentes zonas da lâmina. Para determinar o grau de inflamação é importante que todos os 10 campos tenham numerosas células epiteliais uterinas.

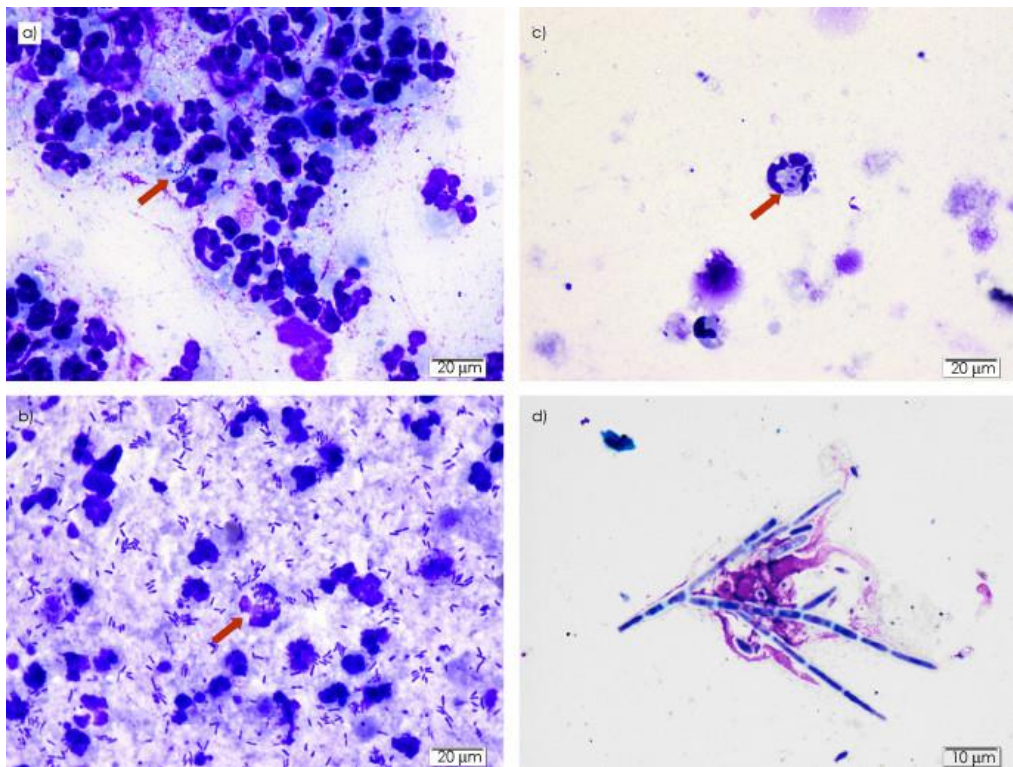
WBC/hpf	Classificação
0-raro	Normal
1-2	Inflamação suave
3-5	Inflamação moderada
>5	Inflamação severa

Outro método de classificação é WBC/UEC. A escala de um neutrófilo por cada 20-40 células é utilizada nas lavagens de baixo volume, uma vez a amostra foi concentrada não é adequado utilizar a WBC/hpf. Existe uma escala para lavagens de baixo volume de modo a ser possível utilizar WBC/hpf.

WBC/hpf	Classificação
0-raro	Normal
>5-10	Inflamação suave
>10	Inflamação severa



Endometrial cytology stained with Diff-Quik. A, Normal endometrial cells. B, Slight inflammatory reaction. C, Mating-induced inflammation (note sperm cells). D, Severe infectious inflammation.



- Eritrócitos

São encontradas em pequena quantidade em citologias normais. Uma quantidade excessiva de eritrócitos indica irritação do endométrio derivada de infecção ou derivados de uma recolha agressiva.

- Bactérias

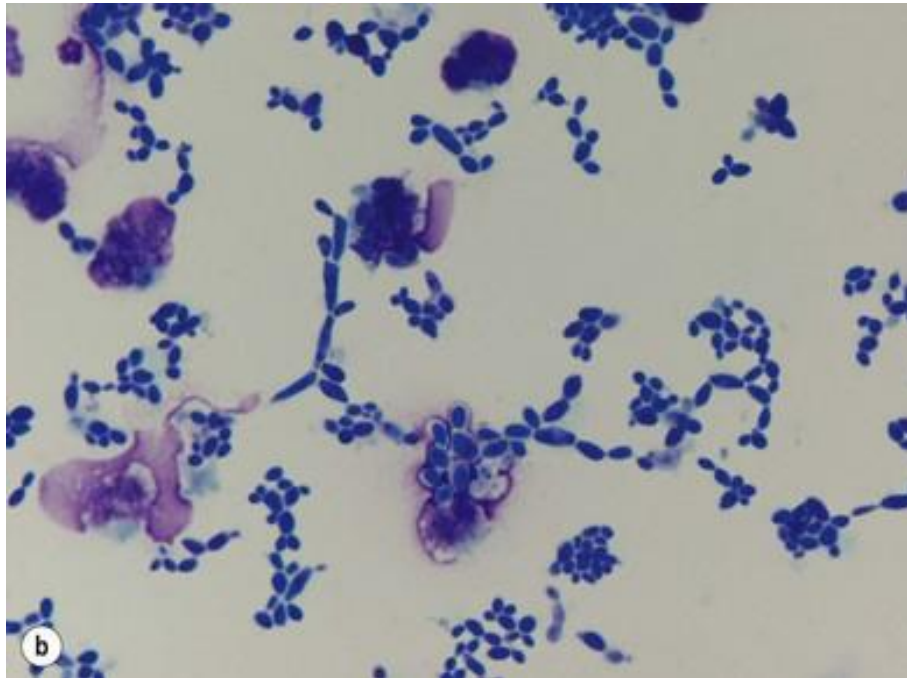
As bactérias requerem uma visualização com a objectiva de 100x e óleo de imersão. A presença de bactérias na citologia associada à presença de neutrófilos ajuda a distinguir a real infecção de contaminação. As bactérias mais comuns em equinos são *Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Está relatado que infecções associadas com *E. coli* e *Pseudomonas* (55% e 52%), eram menos prováveis de serem associadas com citologia positiva comparada com éguas infectadas com *Streptococcus* b-hemolítico (65%). (Riddle et al., 2007).

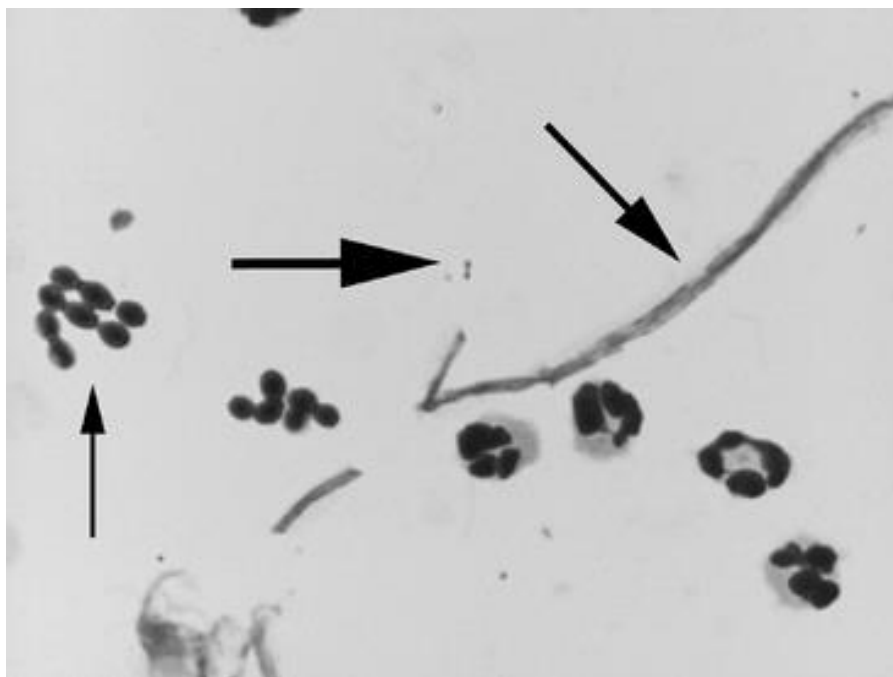
70% das éguas com culturas positivas estão associadas à presença de células inflamatórias.

- Fungos/leveduras

As leveduras distinguem-se das células pela presença de um halo em redor do organismo, este halo é especialmente evidente se o organismo estiver cercado de detritos ou outras células. As hifas são muitas vezes visualizadas na citologia e são o único indicador de infecção fúngica uma vez que nem sempre os fungos crescem na cultura.



Fungos



Neutrófilos no canto inferior direito. Seta grande – bactérias. Seta média – fungos. Seta fina – Hifas.

- Detritos

Os detritos são resultados de células uterinas epiteliais degeneradas, muco, material proteico e cristais da coloração.

% Detritos na lâmina	Classificação
<25%	Nada ou mínimo
25-50%	Médio
>75%	Moderado/Severo

A presença de detritos moderados a severos tem sido associado à presença de bactérias e endometrite.

- Cristais de urina

Estão presentes em citologias de éguas que têm refluxo urinário para a vagina e útero.

Protocolo cultura Gelose chromid CPS Elite/gelose Columbia ANC + 5% sangue de carneiro

As placas devem estar armazenadas dentro da embalagem, entre -2 a -8°C, protegidas da luz.

Devem ser respeitadas todas as normas e boas práticas laboratoriais em todas as fases do processo.

Quando houver intenção de fazer citologia e cultura com zaragatoa, realizar em primeiro lugar a citologia em lamina estéril e só depois a inoculação na placa.

Material:

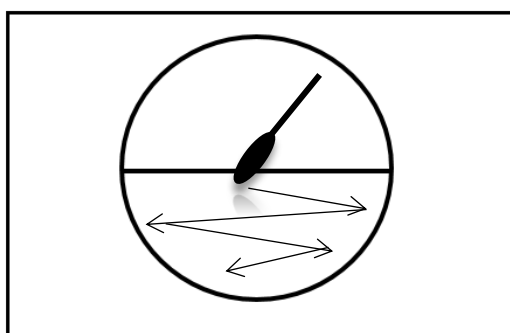
- Placas Gelose Chromid CPS Elite/Gelose Columbia ANC + 5% sangue carneiro;
- Zaragatoa/Pinça de biópsia/Soro e sonda de lavagem uterina;
- Pinça esterilizada;
- Ansa 1µ esterilizada;
- Tubo de Falcon;
- Câmara de fluxo laminar;
- Estufa de bacteriologia.

Procedimento

1 – Deixar as placas atingirem a temperatura ambiente (a zaragatoa/líquido de lavagem de baixo volume/biópsia devem estar igualmente à temperatura ambiente). Manter sempre a placa invertida.

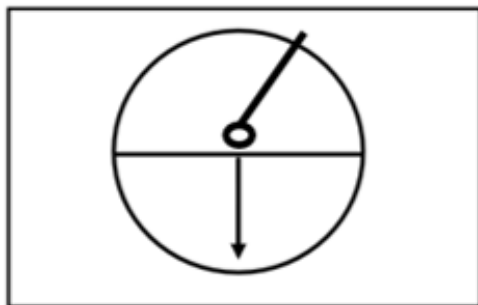
3 – Inocular a amostra no menor espaço de tempo entre a colheita e a inoculação.

4 – Inoculação com zaragatoa na câmara de fluxo laminar:

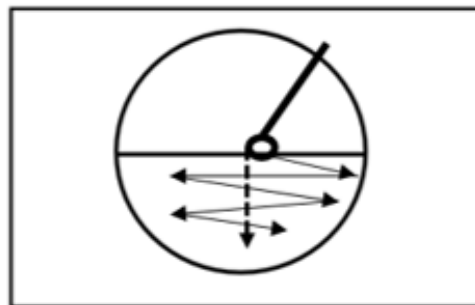


1 – Iniciar a inoculação no meio CPSE. Colocar a zaragatoa no centro, junto à divisão e fazer a zaragatoa rolar pela placa, trabalhando de um lado da placa para o outro, passando pelo centro. Devem ser feitas cerca de 10 estrias.

5 – Inoculação com líquido de lavagem de baixo volume na câmara de fluxo laminar:

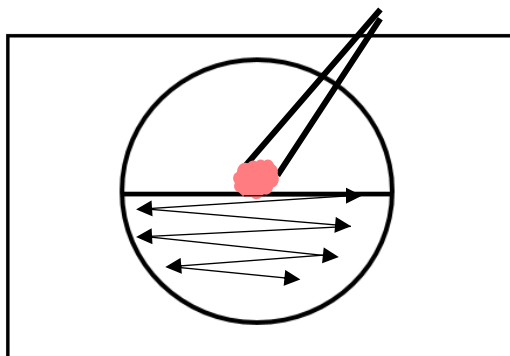


I - Mergulhar a ansa de 1 μ no líquido e traçar o raio da placa com a mesma para dispensar o líquido contido.



II - Sem adicionar mais líquido, fazer traços perpendiculares juntos por toda a placa. Fazer um grande número de estrias.

6 – Inoculação da biópsia em câmara de fluxo laminar:



Com uma pinça estereilizada fazer deslizar a amostra recolhida na biópsia pela placa, começando pelo meio CPSE.

7 - Incubar a placa invertida a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ em condições aeróbicas. As culturas devem ser examinadas entre 18 a 24h após a incubação e às 48h.

Leitura e Interpretação:

A identificação de *E.coli* é feita através da observação de colónias vermelhas a carmim. A β -GLU é a enzima responsável pela coloração azul e azul esverdeado, enquanto a β -GAL é responsável por colónias rosa e *bordeaux*. Algumas estirpes de *E.coli* não apresentam qualquer atividade de β -glucuronidase (β -GLU) ou β -galactosidase (β -GAL), produzindo uma pigmentação rosa claro a creme. A deteção de indol é potencializada pela inclusão de triptofano na gelose do meio, a confirmação definitiva da presença de *E.coli* só é possível pela produção de indol (Scarpato et al., 2002).

A identificação de outros agentes é presuntiva a nível do grupo ou género. Pequenas colónias em tom turquesa ou azul claro a verde indicam a presença do género *Enterococcus*, β -GLU positivas. Colónias em tom azul a verde maiores indicam grupo KESC. Colónias em tom castanho difuso ou colónias com halo castanho apontam para a presença de *Proteeae*. O castanho difuso é característico de estirpes produtoras de desaminase. *Staphylococcus saprophyticus* são caracterizadas por um tom rosa claro. *Streptococcus agalactiae* é indicado pela presença de colónias azuis, violeta azulada a violeta. As colónias de *Candida Albicans* são cremes a brancas e convexas, as colónias de *Candida spp.* têm um pobre desenvolvimento e apresentam colónias muito pequenas e nem sempre são fáceis de ver. Os *Lactobacillus spp.* não se desenvolvem neste meio (Scarparo et al., 2002). É importante registar a presença de hemólises características, como α -hemólise, coloração esverdeada em redor da colônia, e β -hemólise, zona clara em volta da colónia ou por baixo da mesma.

Microrganismo	Características na placa
<i>Acinetobacter spp</i>	Colónias cremes
<i>Candida spp.</i>	Colónias convexas cremes/brancas
<i>Citrobacter spp</i>	Colónias azul a verde
<i>E-coli</i>	Colónias vermelhas a carmim (2-3mm)
<i>Enterobacter spp</i>	Colónias azul-verde
<i>Enterococcus</i>	Colónias tom turquesa/azul claro a verde (0.5 – 1mm)
<i>Proteeae</i>	Colónias castanho difuso a creme ou com halo castanho em “enxame”
<i>Pseudomonas spp.</i>	Colónias transparentes, amarelas a cremes com ou sem halo verde
<i>Salmonella spp.</i>	Colónias cremes
<i>Staphylococcus spp.</i>	Colónias brancas opacas a amarelo dourado (2-3mm)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Pequenas colónias em tom rosa claro a branco
<i>Streptococcus spp.</i>	Colónias azuis claras (0,5 – 1mm). B-hemólise
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Colónias em tom violeta azulado a violeta
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Colónias tom azul metálico a azul esverdeado (2-4mm)
Hemólise alfa	Coloração esverdeada em redor da colónia
Hemólise beta	Coloração clara em redor da colónia ou por baixo

(C. Scarparo · P. Piccoli · P. Ricordi · M. Scagnelli, 2002)

Microrganismo	Características ao microscópio e coloração gram
<i>Acinetobacter spp</i>	Gram -. Pleomórficas, sendo cocobacilos (algumas células mais esféricas e outras mais alongadas como bacilos), assumindo a forma esférica (cocoide) em condições nutricionais adversas.
<i>Candida spp.</i>	Gram +. Células globosas, ovaladas ou alongadas.
<i>Citrobacter spp</i>	Gram -. Bacilos aeróbios.
<i>E-coli</i>	Gram -. Bacilos aeróbias e anaeróbias facultativas.
<i>Enterobacter spp</i>	Gram -. Anaeróbio facultativo.
<i>Enterococcus</i>	Gram +. Diplococos (cocos em pares) ou em cadeias pequenas. Difícil de distinguir de <i>streptococcus spp.</i>
<i>Proteeae</i>	Gram -. Bacilos. Anaeróbia facultativa
<i>Pseudomonas spp.</i>	Gram -. Bacilos.
<i>Salmonella spp.</i>	Gram -. Bacilos flagelados.
<i>Staphylococcus spp.</i>	Gram +. Cocos em cachos de uva. Anaeróbios facultativos. Catalase +.
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
<i>Streptococcus spp.</i>	Gram +. Cocos em pares ou cadeias curtas/longas.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Catalase - / Oxidase -
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram -. Bacilos. Anaeróbia facultativa.

Microrganismo	Catalase	Oxidase
<i>Acinetobacter spp</i>	+	-
<i>Candida spp.</i>	+	+
<i>Citrobacter spp</i>	+	-
<i>E-coli</i>	+	-
<i>Enterobacter spp</i>	+	-
<i>Enterococcus</i>	-	-
<i>Proteeae</i>	+	-
<i>Pseudomonas spp.</i>	+	+
<i>Salmonella spp.</i>	+	-
<i>Staphylococcus spp.</i>	+	+
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	+	+
<i>Streptococcus spp.</i>	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	-

Microrganismo	Características de infecção e antimicrobianos
<i>Acinetobacter spp</i>	Carbapenema. É resistente à penicilina, cloranfenicol e aminoglicosídeos.
<i>Candida spp.</i>	Nistatina, anfotericina B, pimaricina e imidazólicos.
<i>Citrobacter spp</i>	Amicacina, gentamicina e ciprofloxacina. Resistente a ampicilina e gentamicina.
<i>E-coli</i>	Gentamicina, amicacina e ciprofloxacina. Resistente a sulfametoxazol-trimetoprima
<i>Enterobacter spp</i>	Gentamicina, cefalosporinas de 4ª geração e ciprofloxacina.
<i>Enterococcus</i>	Ampicilina, penicilina e vancomicina. Forma biofilme
<i>Proteeae</i>	Ampicilina, carbenicilina, ticarcilina, piperacilina, cefalosporinas, fluoroquinolonas, gentamicina. Resistente a tetraciclina.
<i>Pseudomonas spp.</i>	Imipenem, meropenem, ciprofloxacina e gentamicina.
<i>Salmonella spp.</i>	Ciprofloxacina
<i>Staphylococcus spp.</i>	Oxacilina, cefazolina, vancomicina, gentamicina e tetraciclina. Resistente à penicilina.
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	
<i>Streptococcus spp.</i>	Penicilina, cefalosporinas 3ª geração e penicilina + clindamicina.
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	cefexitina, ciprofloxacina, gentamicina e imipenem

Antimicrobiano	Dose	Utilização
Gram +		
Penicilina	5U/4-5g	Muito eficaz contra <i>Streptococcus</i> . Económico
Carbenicilina	2-5g	Reservar para <i>Pseudomonas</i> resistentes. Efeito sinérgico com aminoglicosídeos, utilizar em dias alternados com aminoglicosídeos. Ligeiramente irritante.
Gram -		
Gentamicina	1-2g	Muito efectivo. Geralmente não irritante quando misturado com igual volume de NaHCO ₃ . Eficaz contra <i>S.zooepidemicus</i> , <i>Enterobacter spp.</i> , <i>E-coli</i> , <i>klebsiella spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> .
Amicacina	1-2g	Utilizado para <i>Pseudomonas</i> , <i>Klebsiella</i> e gram negativos resistentes. Diluir em 20ml de água oxigenada e 40ml de soro ou água estéril. Indicado em caso de biofilme.
Canamicina	1g	Tóxico para espermatozóides, não utilizar próximo da época de reprodução.
Polimicina	1U	Particularmente efectivo contra <i>Pseudomonas</i>
Neomicina	3-4g	Muito eficaz contra <i>E-coli</i> , pode ser irritante. Não utilizar perto da inseminação.
Gram + e gram -		
Ampicilina	1-3g	Pode ser muito irritante. Utilizar em altas diluições. O sal de sódio precipita no endométrio e permanece lá por longos períodos. Funciona contra gram – e <i>E-coli</i>
Cefazolina	1g	
Ticarcilina	1-3g	Eficaz contra <i>Pseudomonas</i> . Até 60ml. Não utilizar para <i>Klebsiella</i> .
Ticarcilina + ácido clavulânico	1-6g	Inibidor de beta-lactamase é eficaz contra <i>S. aureus</i> e <i>enterobacter</i> . Infundir no mínimo com 200ml
Ceftiofur	1g	Deve ser administrado SID, IM ou por infusão uterina. Pode ser utilizado juntamente com DMSO em caso de biofilme. 20ml de DMSO + 20ml de soro.
Ciprofloxacina		Esmagar um comprimido e diluir em 40ml de NaCl + 20ml de água oxigenada. Indicado em caso de biofilme.
Enrofloxacin	250mg	Diluir até 60ml. Perigosa quando mais concentrada.
Fungo e leveduras		
Nistatina	0,5 – 2,5 U	Principalmente para leveduras em fase de crescimento. Insolúvel, deve ser suspenso em 100-200ML de água estéril e vigorosamente agitado no momento antes da infusão.
Anfotericina B	100-200 mg	Para infecções por <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Mucor</i> ou <i>Histoplasma</i> . Diluir em 100-250ml de água estéril.
Clotrimazole	500 – 700 mg	Para infecções por leveduras. Esmagar os comprimidos e misturar com 40ml de água estéril.
Fluconazole	100 mg	Para infecções por <i>candida spp.</i>
Miconazole	200 mg	Mais eficaz para infecções por leveduras e fungos resistentes. Fazer infusão uma vez por dia, durante 10 dias. Diluir em 40-60ml de água salina antes da infusão.



Protocolo zaragatoa

Material:

- Zaragatoas (double guarded minitube);
- Betadine espuma;
- Lamina estéril;
- Meio de cultura CPS elite;

Procedimento:

1. Prender a cauda do animal e lavar a zona da vulva e perineal com betadine espuma;
2. Introduzir a zaragatoa no útero e avançar o cotonete de modo a ficar em contacto com o útero;
3. Fazer movimentos rotativos com o cotonete pelo menos durante 30 seg;
4. Voltar a introduzir o cotonete no plástico e retirar do útero;
5. O cotonete é então retirado do involucro e rolado numa lamina estéril;
6. Por ultimo é feita a cultura nas placas de CPS elite.



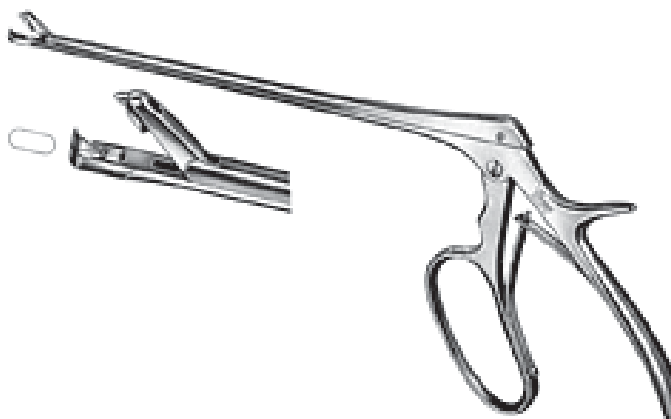
Zaragatoa Minitube

Material:

- Pinça de biópsia tipo Spring handle;
- Laminas estéreis;
- Pinça metálica
- Lamparina
- Betadine.

Procedimento:

7. Prender a cauda do animal e lavar a zona da vulva e perineal com betadine espuma;
8. Segurar a pinça, previamente esterilizada, com uma luva de palpação invertida e passar pela vagina;
9. Atravessar o cérvix e passar a mão para o recto;
10. Abrir o fórceps e com o dedo, através do recto, posicionar um pedaço de endométrio;
11. Fechar o fórceps e puxar;
12. Retirar o instrumento do útero e retirar delicadamente o pedaço de endométrio com uma pinça estéril e colocar numa lamina esterilizada na lamparina.





Protocolo
Lavagem Uterina de Alto Volume

Material:

- Sonda uterina
- Tubo de Falcon estéril
- Centrifuga
- Pipeta
- Ansa 1 μ estéril
- Laminas estéreis
- Lamparina
- Meio de cultura (ChromID CPS Elite)
- Diff Quick
- Estufa
- Camara de fluxo laminar
- Microscópio e óleo de imersão

*Devem ser sempre cumpridas as regras de bom funcionamento laboratorial.

Procedimento:

1. Acondicionar a cauda e lavar a zona da vulva e do períneo com iodopovidona espuma e água corrente 3x e em seguida secar com papel.
2. Colocar uma luva estéril e acoplar uma sonda uterina estéril a uma embalagem de 1L de NaCl 0,9%.
3. Passar a sonda pelo cérvix até ao útero e avançar cerca de 12cm.
4. Passar 100-200mL de NaCl 0,9% e massajar o útero pela via transrectal pelo menos 30 segundos.
5. Colher o líquido para um tubo de Falcon estéril.
6. Centrifugar o líquido colhido a 410 rpm durante 10 minutos.
7. Remover a maior quantidade de subrenadante e homogeneizar o pellet com uma pipeta.
8. Mergulhar a ansa de 1 μ no pellet e colocar na placa de cultura como descrito no protocolo de cultura Gelose chromID CPS Elite.
9. Mergulhar a ansa novamente no pellet e distribuir pela lamina esterilizada.
10. Corar a lamina como descrito no protocolo Coloração Diff Quick e analisar.